

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de EstomatologíaII
(Odontología Conservadora)



**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL
CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS ADHESIVOS
AUTOGRABANTES FRENTE A GÉRMENES DE LA
CAVIDAD ORAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

David Rubio Flores

Bajo la dirección de los doctores

Vicente Vera González
Álvaro Enrique García Barbero
Ernesto García Barbero

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología II (Odontología Conservadora)



**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL
CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS ADHESIVOS
AUTOGRABANTES FRENTE A GÉRMEENES DE LA CAVIDAD
ORAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Rubio Flores

Bajo la dirección de los Doctores:

Vicente Vera González

Álvaro Enrique García Barbero

Ernesto García Barbero

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología II (Odontología Conservadora)



**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL
CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS ADHESIVOS
AUTOGRABANTES FRENTE A GÉRMENES DE LA CAVIDAD
ORAL**

MEMORIA

que para la obtención del Grado de Doctor en Odontología,
presenta

D. David Rubio Flores
Licenciado en Odontología

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología II (Odontología Conservadora)



**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL
CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS ADHESIVOS
AUTOGRABANTES FRENTE A GÉRMENES DE LA CAVIDAD
ORAL**

TESIS DOCTORAL

D. David Rubio Flores

Licenciado en Odontología

DIRECTORES

Dr. D. Vicente Vera González

Dr. D. Álvaro Enrique García Barbero

Dr. D. Ernesto García Barbero

*A mis padres y mis hermanas, por haberme
convertido en lo que soy.*

*A Marta, por ser la causa de mi sonrisa, por darme
tu mano cuando me caigo y ser la primera en
abrazarme cuando me levanto.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría remarcar mi más sincero agradecimiento a los tres Doctores que codirigen esta Tesis Doctoral.

Al Doctor Vicente Vera González, por haberme abierto las puertas de su despacho para iniciarme en la investigación sin esperar nada a cambio. Gracias por tu buen hacer como profesor, tutor, codirector de Tesis y, sobretodo, como AMIGO y COMPAÑERO.

Al Doctor Álvaro Enrique García Barbero, por haber aceptado el reto de enrolarse en un barco que ya había zarpado, aportando toda su experiencia y su buen hacer. Sin tu tiempo y dedicación no habríamos logrado alcanzar esta meta.

Al Doctor Ernesto García Barbero, uno de mis mentores en endodoncia. Por haberme enseñado que no hay nada como la combinación de tranquilidad y conocimientos (paz+ciencia) para la consecución de resultados.

Quiero agradecer el apoyo encontrado desde el primer día en el Departamento de Odontología Conservadora, donde me he sentido como en casa, y en especial a su Director, el Doctor Javier García Barbero. Gracias a todos los profesores, colaboradores, gutapercheros, compañeros doctorandos o personal auxiliar por haber facilitado un ambiente cómodo en el que trabajar. Mención especial para todos los que forman o han formado parte de Compleja por hacer de los jueves una mañana

genial. Ánimo a todos mis compañeros que van por este camino: Natalia, Bea, Ignacio, Ana... para que se os haga el camino más sencillo.

Mi más profundo agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UCM: Itziar, Ana, Lola y Conchita. Infinitas gracias por vuestras horas preparando placas, inóculos y medios de cultivo, por vuestro asesoramiento para la interpretación de los datos y por haber aprendido tanto sobre CMI.

A D. Ricardo García Mata, analista del Centro de Apoyo a la Investigación de Estadística de la UCM, por su labor irremplazable en el análisis estadístico y por su tiempo y esfuerzo para explicarnos el fenómeno de interacción.

Esta Tesis no hubiera llegado a este punto sin el ejemplo de trabajo, esfuerzo y compromiso que he tenido en mi familia. Gracias por haberme enseñado a ser mejor persona y por estar en todo momento a mi lado.

Por último, agradecer el apoyo de mis amigos, que son los que te levantan en los momentos de desazón y te relajan en los de exaltación. Aquí entráis todos los que, en uno u otro momento, me habéis animado a seguir, a no dejarlo de lado, a terminar este proyecto. ¡Esta Tesis es de todos vosotros!

Y a ti, por haber dicho que sí y haberme hecho la persona más feliz.

ÍNDICE

	Página
Justificación	8
Introducción	12
Hipótesis de trabajo	52
Objetivos	55
Material y método	58
Resultados	71
Discusión	120
Conclusiones	141
Abstract	144
Bibliografía	152

—● JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La odontología adhesiva ha experimentado un enorme auge en los últimos tiempos, constituyendo hoy día la base sobre la que se fundamentan la mayoría de los tratamientos de operatoria dental. Se han realizado grandes avances en aspectos como la capacidad de adhesión y sellado de los adhesivos, la facilidad de manejo, la estabilidad de la interfase o la durabilidad de las restauraciones. El desarrollo de los adhesivos autograbantes en particular ha permitido implementar técnicas adhesivas más sencillas y menos agresivas para los tejidos dentarios, convirtiéndolos en materiales de primera elección por los clínicos en muchas situaciones.

Sin embargo, aún existen problemas que es necesario resolver. Por un lado, los métodos de detección y eliminación de caries actuales no permiten asegurar en todos los casos una perfecta erradicación de las bacterias en la lesión, por lo que en ocasiones pueden persistir gérmenes que hagan progresar la caries y conduzcan en definitiva al fracaso de la restauración. Por otro lado, diversas causas pueden llevar a que se produzcan defectos de sellado en las restauraciones adhesivas, indetectables clínicamente, pero que pueden inducir filtración marginal posterior, con la subsiguiente invasión bacteriana y posible recidiva de caries¹. La presencia previa, o la posterior recolonización de bacterias por filtración, constituyen la principal causa de fracaso en las restauraciones dentales². Además, los sistemas adhesivos están implicados en otras situaciones clínicas en las que pueden estar en contacto con gérmenes de la cavidad oral, como es en el caso del cementado de restauraciones protésicas indirectas, aparatología ortodóncica o postes de retención intrarradiculares.

En estos casos, sería interesante conocer el posible efecto inhibitorio de los adhesivos empleados no solo sobre gérmenes cariogénicos, sino también frente a microorganismos no cariogénicos, pero potencialmente patógenos, localizados en los conductos radiculares, en la placa bacteriana sub y supragingival o en el fluido crevicular.

Hasta el momento se han realizado diferentes estudios sobre la capacidad antibacteriana de algunos sistemas adhesivos, tanto de grabado total como de autograbado, que parecen evidenciar una capacidad inhibitoria parcial sobre el crecimiento de ciertos microorganismos cariogénicos, atribuible a características propias del adhesivo (pH, mecanismo de polimerización, composición química), a la inclusión en su formulación de monómeros antibacterianos (MDPB, DMAE- CB,), o de agentes antisépticos (clorhexidina)^{3,4,5,6,7,8}. Sin embargo, existen aspectos que aún no han sido suficientemente estudiados, entre los que destacan:

- La capacidad antibacteriana de algunos de los nuevos sistemas adhesivos de autograbado.
- Su comparación con la de sistemas adhesivos no autograbantes.
- Los fundamentos del citado efecto antibacteriano, y en particular la influencia del pH en el mismo.
- El efecto sobre otras especies bacterianas presentes en la cavidad oral no directamente relacionadas con la aparición de caries.
- La importancia del método de medición de la capacidad antibacteriana en los resultados de los estudios.

La necesidad de ampliar los conocimientos sobre todos estos aspectos en relación con el potencial antibacteriano de los sistemas adhesivos justifica a nuestro entender la realización de este trabajo.

—● INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. FLORA ORAL

1.1 Microbiota de la cavidad oral

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos que colonizan permanentemente a la mayoría de los individuos sanos de la población, y que ejercen sobre éstos un efecto beneficioso al encargarse de impedir la colonización por otros microorganismos no adaptados a ese hábitat (fenómenos de competencia inter-especie) o activar el sistema inmune.

Aunque la colonización por estos microorganismos suele considerarse beneficiosa, un gran número de infecciones son causadas por microorganismos pertenecientes a nuestra propia microbiota (estafilococos, estreptococos, etc.) y no por las especies ambientales que constantemente están en contacto con nosotros.

La microbiota de la cavidad oral es muy compleja, aislándose más de 700 especies que la habitan o transitan por ella. Algunas de ellas son causantes de patologías de alta incidencia, como la caries o la enfermedad periodontal. Esta microbiota es además cambiante dentro de un mismo ecosistema oral, sustituyéndose unos microorganismos por otros, debido a cambios en el hábitat (sucesión alogénica) o en las condiciones ambientales (sucesión autogénica).

Los factores que influyen en la composición, el desarrollo, la cantidad, la coexistencia y la distribución de la microbiota oral son:

- Factores físico-químicos como el grado de humedad, el pH, la temperatura y el potencial de óxido- reducción.
- Factores de adhesión, agregación y coagregación.
- Factores nutricionales, provenientes de los tejidos o secreciones del huésped (fuentes endógenas), de otros microorganismos (fuentes bacterianas) y de la dieta (fuentes exógenas).
- *Factores protectores del huésped, como la integridad de la mucosa y los dientes, la descamación celular, la masticación, deglución y succión de alimentos, los tejidos linfoides, la saliva o el líquido crevicular. Los pacientes portadores de prótesis dentales removibles son más propensos a ser colonizados por bacterias que los de prótesis fijas*⁹. Especialmente en aquellos casos con estomatitis protésica, las cepas más frecuentemente aisladas son *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y en menor medida *Streptococcus mutans*^{10,11}.
- Factores antagónicos bacterianos: en un ecosistema como la cavidad oral en el que conviven multitud de microorganismos es frecuente que se produzcan interacciones que pueden ser perjudiciales para algunos de ellos.

1.2 Ecosistemas bacterianos orales

La cavidad oral puede ser considerada como un gran ecosistema formado por una amplia población bacteriana en el conjunto de ecosistemas primarios que componen la cavidad (superficies dentales, lengua, surco gingival). La inmensa mayoría de las bacterias residentes en la cavidad son compatibles con la salud del huésped. Sin embargo, bajo determinadas condiciones y comportamientos del huésped y debido a los mecanismos de virulencia de los microorganismos, el equilibrio establecido entre la microbiota oral y los tejidos se rompe, pasando a un estado de **disbiosis**.

Podemos hablar de seis ecosistemas diferentes en la cavidad oral:

- 1.2.1 **Saliva:** en la que predominan cocos Gram positivos anaerobios facultativos (45%), cocos Gram negativos (15%) y bacilos Gram positivos (15%).
- 1.2.2 **Mucosa:** predominan los cocos Gram positivos anaerobios facultativos (90%) como el *Streptococcus viridans*.
- 1.2.3 **Surco gingival:** cerca del 50% de los microorganismos son cocos Gram positivos anaerobios facultativos *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus gordonii*. En el surco no hay saliva, debido a que existe una presión negativa proveniente de las encías que impide su paso.
- 1.2.4 **Dorso de la lengua:** abundan microorganismos anaerobios facultativos (*Streptococcus salivarius*), cocos Gram negativos anaerobios estrictos y bacilos Gram positivos anaerobios facultativos.

1.2.5 **Superficies dentales:** las especies más relevantes son las que producen las caries dentales, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus viridans*. Se ha demostrado la capacidad de los microorganismos patógenos de la cavidad oral de penetrar en los tubulillos dentinarios. Sen et al. hallaron niveles de penetración variables de 10 a 150 μm ¹². Según estudios *in vitro*, parece haber una relación inversamente proporcional entre la edad de los sujetos y la penetración de dichas bacterias¹³.

1.2.6 **Materiales artificiales:** no están considerados como ecosistemas primarios, aunque sí cuentan con una frecuente colonización por parte de los microorganismos que hace que sea considerado como un ecosistema más a tener en cuenta.

1.3 Géneros bacterianos presentes en la microbiota oral

1.3.1 Género *Streptococcus*

Son cocos Gram- positivos, de 0,6 a 2 μm de diámetro¹⁴, no esporulados, asociados en parejas o cadenas, aerobios, aunque pueden ser anaerobios facultativos. Su metabolismo es de tipo fermentativo, produciendo ácido láctico a partir de azúcares, produciendo polisacáridos extracelulares, implicados en la adhesión a las caras libres dentarias, e intracelulares, asociados al metabolismo energético. Son mesófilos, con una temperatura óptima de crecimiento de 36°C.

Reúnen tres características fundamentales:

- Acidófilos, por vivir en medios con un pH bajo.
- Acidogénicos, por metabolizar los azúcares en ácidos, reduciendo el pH.
- Acidúricos, por sintetizar ácido pese a vivir en medios ácidos.

Hay cepas patógenas para el ser humano y otras simplemente oportunistas, formando parte de la microbiota oral. Se pueden clasificar en función de la capacidad de lisar los glóbulos rojos, diferenciándose en β - hemolíticos (hemólisis total de los eritrocitos, generando un halo incoloro en cultivos en agar- sangre), α - hemolíticos o viridans (hemólisis parcial, produciendo un halo verdoso) y γ - hemolíticos (no producen cambios).

Los estreptococos viridans, entre los que destacan *Streptococcus mutans* o *Streptococcus sobrinus*, son los microorganismos con mayor importancia en la cavidad oral, donde tienen su hábitat principal, colonizando superficies duras y blandas. Son detectables en todos los ecosistemas primarios¹⁵. Sus niveles se incrementan especialmente en pacientes infantiles^{16,17,18}. Entre las patologías que causan se diferencian la formación de placas dentales¹⁹, la producción de caries^{20,21,22,23}, gingivitis y periodontitis^{24,25}, abscesos periapicales, pulpitis, celulitis... Fuera del ámbito oral es un frecuente patógeno u oportunista vaginal, intestinal, dermatológico e incluso causante de endocarditis. Se trata de un amplio grupo compuesto por cuatro

subgrupos: grupo *Streptococcus mutans*, grupo *Streptococcus oralis*, grupo *Streptococcus milleri* y grupo *Streptococcus salivarius*.

La especie más frecuente del grupo es *Streptococcus mutans*, aislada en el 70-90% de la población no desdentada y causantes del 7- 14% de las endocarditis subagudas. Está considerado como el microorganismo cariogénico por excelencia, siendo fácilmente detectable en placa supragingival y subgingival, dentina radicular y saliva. La relación entre *Streptococcus mutans* y la caries dental está basada en:

- Incrementos en el recuento de *Streptococcus mutans* en sujetos predispuestos o con caries activas.
- Capacidad de inducción de caries en animales de experimentación o protección cuando hay inmunidad frente a antígenos del microorganismo.
- Factores de cariogenicidad:
 - Poder acidógeno, acidúrico y acidófilo.
 - Síntesis de polisacáridos intracelulares y extracelulares.
 - Capacidad de adhesión a superficies dentales, y de agregación y coagregación con otros microorganismos.

Streptococcus mutans tiene incluso la capacidad de adherirse y colonizar materiales artificiales, como por ejemplo brackets de ortodoncia²⁶ o prótesis

completas acrílicas²⁷, asociándose con mayores niveles de inflamación gingival y presencia de placa supragingival²⁸.

En una revisión sistemática de Parisotto et al., hallaron asociación positiva entre los niveles salivales o en biofilms de *Streptococcus mutans* y caries en pacientes preescolares²⁹. Así, existen en la bibliografía numerosos estudios que correlacionan positivamente la presencia de *Streptococcus mutans* y/ o *Streptococcus sobrinus* con la incidencia de caries^{30,31,32,33}. De hecho, en los pacientes infantiles parece existir correlación significativa no solo entre sus recuentos microbiológicos de *Streptococcus* o *Lactobacillus* y el número de caries³⁴, sino también con el índice de caries de sus padres o cuidadores escolares^{35,36,37}, la edad de los padres, el índice de renta familiar o el control de placa bacteriana³⁸.

1.3.2 Género *Lactobacillus* o bacterias del ácido láctico

Se trata de un género de bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, que engloba a más de 40 especies, descrito inicialmente por Beijerinck en 1901. Según su morfología son pleomorfos, agrupándose en parejas, cadenas o en empalizada⁶⁶.

Se clasifican según su metabolismo en dos subgrupos:

1. Homofermentativos: solo producen ácido láctico a partir de los hidratos de carbono. Destacan en este grupo *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus salivarius*.

2. Heterofermentativos: producen ácidos acético, láctico, fórmico, etanol y dióxido de carbono. Según la vía metabólica que sigan se les diferencia entre estrictos y facultativos. Destacan *Lactobacillus casei* (facultativo) y *Lactobacillus fermentum* (estricto).

Para el cultivo de *Lactobacillus* se aplican condiciones con un 5- 10% de CO₂, en medios específicos para *Lactobacillus*, con un pH ligeramente más ácido que los medios generales por su naturaleza acidófila.

Pertenecen a la microbiota normal en la cavidad oral, la vagina y el aparato digestivo de mamíferos. Sus niveles pueden variar en caso de enfermedades relacionadas (colonización por otros microorganismos, caries, enfermedad periodontal) y su crecimiento está fuertemente asociado al cultivo junto a otras cepas como *Actinomyces* o *Streptococcus mutans*³⁹.

En la cavidad oral destaca su papel una vez iniciada la caries dental^{17,40,41} durante su etapa de desarrollo, al descender el pH en torno a 5,4, especialmente en pacientes infantiles, donde existe correlación entre los niveles salivales de *Lactobacillus* y la presencia de caries, ausencias dentarias u obturaciones^{18,42}.

Debido a la ausencia de capacidad de adhesión, su acción cariogénica se centra en zonas retentivas. Destaca su poder acidógeno y acidúrico, produciendo altas cantidades de ácidos a partir de la glucosa^{43,44}. De hecho, la presencia de *Lactobacillus* en la placa dental se asocia al consumo de azúcares⁴⁵.

Se trata de un género que presenta actividad como probiótico, es decir, que ingeridos en la dieta, sobreviven en el intestino ayudando al equilibrio de la flora bacteriana. La actividad probiótica de *Lactobacillus* se basa en la específica coagregación que realizan con *Streptococcus mutans*⁴⁶. Se han hecho numerosos estudios para determinar qué cepas eran capaces de presentar esta característica. Así, algunos *Lactobacillus* (como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus salivarius*) son capaces de actuar como probióticos e inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, como *Streptococcus mutans*^{47,48,49,50,51}, *Candida albicans*^{52,53} o las de la placa bacteriana supragingival y subgingival⁵⁴, entre otras *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* o *Prevotella intermedia*^{55,56}. Gracias a esa inhibición, reducen los índices de placa, sangrado y sondaje periodontal^{57,58} o ayudan al control de la halitosis⁵⁹ y parecerían ser capaces de prevenir la caries dental. Sin embargo, no todas las cepas probióticas inhiben por igual el crecimiento de bacterias cariogénicas; así, una dieta con ingesta diaria del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* no modifica los niveles de *Streptococcus mutans* o *Lactobacillus spp*⁶⁰ e incluso parece estar implicado en la progresión de caries en dentición primaria⁶¹ o la producción de infecciones agudas a distancia⁶². Del mismo modo, *Lactobacillus paracasei* no parece capaz de modificar los

recuentos de bacterias cariogénicas en pacientes sanos, no estando claro su efecto como agente preventivo de caries⁶³. Otro probiótico, *Lactobacillus salivarius*, ha demostrado actividad cariogénica por sí mismo, que, asociado a su capacidad de adherencia a la hidroxiapatita, le convierten en un potente agente causal de caries dental⁶⁴.

Dos de las cepas con mayor implicación en la cavidad oral son *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

1.3.2.1 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un microorganismo anaerobio y heterofermentativo facultativo, muy resistente a amplios rangos de pH y temperatura, que actúa como complemento al crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*. Se aísla frecuentemente de la saliva y el jugo pancreático, facilitando la digestión. Son capaces de sobrevivir al paso por el sistema gastrointestinal, donde realizan su actividad moduladora de la absorción.

1.3.2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Microorganismo anaerobio facultativo y homofermentativo. Es muy resistente a amplios rangos de pH y temperatura, siendo los 45º C su temperatura óptima de crecimiento. Crece de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos leche, carnes, pescados o cereales. Al igual que otros *Lactobacillus* es flora habitual en la boca, la vagina y el intestino. A partir de los azúcares de la dieta produce

exclusivamente ácido láctico, que favorece el descenso del pH salival y el riesgo de desmineralización de los tejidos dentarios.

1.3.3 Género *Actinomyces*

Definido por Harz en 1877, *Actinomyces*^{65,66,67} es un género de bacterias Gram-positivas, anaerobias estrictas o facultativas, con localización preferente en la cavidad oral, el aparato genital femenino y las criptas amigdalares. Son microorganismos con un gran pleomorfismo, pudiendo aparecer aislados, en parejas, en cúmulos irregulares similares a los rayos del sol o en cadenas similares a hifas. Su metabolismo es de tipo heterofermentativo, produciendo ácidos (succínico, láctico o acético) a partir de los hidratos de carbono.

En la cavidad oral, las especies de *Actinomyces* se detectan frecuentemente en zonas con bajos niveles de oxígeno (surco gingival, bolsas periodontales, conductos radiculares infectados^{68,69,70}, cálculo, caries, zonas periimplantarias, capuchones de terceros molares). Las dos más importantes a nivel oral son *Actinomyces odontolyticus*, relacionada con el avance de lesiones de caries y *Actinomyces naeslundii*, con caries radiculares^{71,72}, caries dentinarias de pacientes infantiles⁷³ y enfermedad periodontal^{74,75,76}. Se ha descrito como la especie más prevalente tanto en placa supragingival como subgingival de pacientes periodontales⁷⁷ y en lesiones periapicales crónicas refractarias a tratamientos de endodoncia⁷⁸. En algunos estudios, sin embargo, hallaron mayores niveles de *Actinomyces* en pacientes sin enfermedad

periodontal que en aquellos con enfermedad periodontal crónica no tratada⁷⁹. De hecho, el tratamiento periodontal de estos pacientes consigue elevar los recuentos de *Actinomyces*⁸⁰ en la microbiota subgingival. Se les considera microorganismos oportunistas, apareciendo con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos⁸¹.

1.3.4 Género *Staphylococcus*

Conjunto de cocos Gram- positivos agrupados en racimos, aerobios y anaerobios facultativos, de 0,5 a 1,5 µm de diámetro⁸². Son muy tolerantes a condiciones extremas como el calor, la desecación, las altas concentraciones salinas o algunos antisépticos. La especie con mayor capacidad patógena es *Staphylococcus aureus*, productora de un gran número de toxinas y enzimas, entre ellas la coagulasa, que las diferencia del resto de estafilococos. Otra cepa muy importante es *Staphylococcus epidermidis*, causante oportunista de infecciones en prótesis, catéteres, sondas⁸³. Estas dos especies son las únicas que se aíslan de la cavidad oral, formando parte de la microbiota transitoria, aunque están implicadas en numerosos procesos patológicos⁸⁴ como infecciones endodónticas, procesos periapicales, osteomielitis, periodontitis⁸⁵.

1.3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Es un patógeno hospitalario muy temido por ser capaz de provocar infecciones localizadas o diseminadas, en cualquier órgano o tejido, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Se localiza en la nasofaringe del 10 al 30% de las personas. En personal hospitalario, estas cifras se amplían hasta el 50- 70%⁸⁵.

A nivel oral, se aísla frecuentemente formando parte de la placa subgingival de bolsas periodontales^{86,87}, siendo mayores sus niveles en caso de periodontitis agresiva⁸⁸. De hecho, especialmente en pacientes de riesgo, la cavidad oral se comporta como nicho para estas bacterias, desde donde migrar a otras zonas generando infecciones a distancia^{89,90,91}. En los casos de patología infecciosa periimplantaria se han aislado altas cifras de *Staphylococcus aureus* asociadas a implantes dentales fracasados⁸⁷.

1.3.4.2 *Staphylococcus epidermidis*

Localizada frecuentemente en piel y membranas mucosas^{84,85}, forma parte de la microbiota normal y como agente contaminante⁹² es probablemente la especie más comúnmente hallada en análisis de laboratorio.

En la cavidad oral conviven como comensales, aunque bien pueden estar involucradas en infecciones oportunistas o incluso formar parte de la placa bacteriana. Se aíslan en caries radiculares, infecciones pulpares y periapicales, gingivitis y

periodontitis... Su presencia como contaminante ambiental de clínica dental aumenta tras la actividad clínica, siendo una de las cepas más frecuentemente encontradas^{93,94}.

1.3.5 Género *Candida*

Aunque el género *Candida* engloba a más de 150 especies de levaduras, la *Candida albicans* es la forma más frecuentemente encontrada en patologías orales. Se trata de un hongo diploide asexual en forma de levadura, perteneciente a la familia de los sacaromicetos⁹⁵. En normalidad, vive en equilibrio con otros microorganismos de la microbiota oral, gastrointestinal y vaginal. Su metabolismo está fuertemente asociado a la digestión de azúcares mediante un proceso fermentativo. La presencia de levaduras en la cavidad oral está cifrada en torno al 25% de la población, siendo *Candida albicans* el 80% de ellas⁹⁶. Sus zonas preferentes de localización son la lengua, el paladar, la mucosa oral y la parte en contacto con la mucosa de prótesis removibles. Estudios *in vitro* de Sen et al.⁹⁷ demuestran la capacidad de esta levadura de crecer, adherirse y colonizar tejido dentario duro, tanto esmalte como dentina y cemento, especialmente en cavidades, surcos o fisuras. De hecho, se asocia al desarrollo de caries debido a la producción de ácidos a partir de la glucosa de la dieta, facilitando la desmineralización de los tejidos duros dentarios⁴³.

Debido a leves alteraciones en la condición del huésped o de la virulencia del hongo, *Candida albicans* puede transformarse en un microorganismo patógeno de

carácter oportunista. Algunos factores asociados son cambios en la cantidad o el tipo de saliva, en la dieta, en el pH, en la temperatura, la presencia de otras bacterias, tratamientos antibióticos o con corticoides, inmunosupresión o retraso mental. De entre ellos, la acción de la saliva es la más importante de todas, al ser un potente mecanismo de defensa que arrastra a las levaduras e impide la colonización de las superficies mucosas, dentales o de materiales artificiales. Otro factor que parece favorecer la adhesión de *Candida albicans* es la presencia de barrillo dentinario⁹⁸. Además, la eliminación del barrillo genera una colonización diferente en forma de pseudohifas desagrupadas mientras que en muestras con barrillo aparecían grandes conglomerados de levaduras formando películas (biofilms)⁹⁹.

1.3.6 Género *Escherichia*

Perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, que abarca hasta 40 géneros y 150 especies de bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, la especie *Escherichia coli*, con un tamaño entre 1 y 6 µm de largo, es un frecuente microorganismo de la cavidad oral^{83,100,101}.

A nivel de la cavidad oral, suelen estar relacionadas con la placa bacteriana subgingival de pacientes periodontales¹⁰², sobreinfecciones pulmonares asociadas a enfermedad periodontal⁹¹ o incluso cuadros de osteomielitis¹⁰³. Pese a ser un frecuente microorganismo de la flora transeúnte de la cavidad oral y contaminante de las aguas, no se ha detectado contaminación por *Escherichia coli* en el agua de las

turbinas ni de las jeringas multifunción tras una actividad clínica diaria¹⁰⁴, pero sí en superficies o dispensadores de jabón⁹⁴.

1.3.7 Género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* engloba a un conjunto de bacterias similar a los estreptococos, que son fácilmente localizables en el tracto gastrointestinal¹⁵. De hecho, hasta 1984, las cepas de *Enterococcus* estaban incluidas dentro del grupo de *Streptococcus*¹⁰⁵. Se caracterizan por su capacidad de supervivencia en medios ricos en sales biliares y cloruro sódico, por lo cual son residentes de la flora gastrointestinal¹⁰⁶. Las especies más frecuentemente encontradas en procesos clínicos son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Estudios epidemiológicos cifran la prevalencia de *Enterococcus* en un 1% para sujetos sin antecedentes endodónticos y 11% en pacientes en tratamiento endodóntico¹⁰⁷.

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram positiva, comensal, anaerobia facultativa, capaz de formar biofilms y con la particularidad de poseer adhesinas capaces de unirse a las células epiteliales que tapizan la mucosa oral, intestinal o urinaria. En la cavidad oral, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, se localizan colonias de *Enterococcus faecalis* en la mucosa oral, el dorso de la lengua y la placa dental como parte de la microbiota¹⁰⁸. Se trata de un microorganismo con

abundantes factores de virulencia que le hacen ser muy resistente a cualquier tratamiento físico o químico¹⁰⁹.

Como bacteria patógena, se han localizado cepas de *Enterococcus faecalis* en pacientes con enfermedad periodontal crónica^{24,108,110}, especialmente en aquellas periodontitis refractarias al tratamiento convencional^{111,112} o en pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor^{113,114}. Existe además correlación entre la presencia de *Enterococcus faecalis* y la profundidad de sondaje, el nivel de adherencia epitelial, o los índices epidemiológicos de placa y sangrado¹¹⁵.

1.3.8 Género *Pseudomonas*

Conjunto de bacterias Gram negativas cuya principal especie es *Pseudomonas aeruginosa*. Es un microorganismo aerobio estricto, no fermentativo, que se comporta como patógeno oportunista en humanos y plantas. Se trata de un microorganismo frecuentemente encontrado como contaminante del agua de clínicas dentales¹¹⁶. Sin embargo, solo se vuelve patógeno en pacientes predispuestos a infecciones. En pacientes hospitalizados se ha detectado una alta prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* en la cavidad oral, tanto en saliva como en la placa bacteriana supragingival, especialmente en pacientes no desdentados⁸⁹.

La presencia y detección de *Pseudomonas aeruginosa* en la microbiota subgingival parece estar fuertemente relacionada con la enfermedad periodontal, cuando aparece asociada a periodontopatógenos primarios como *Actinobacillus/Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*^{117,118}, siendo mayor su importancia en casos de periodontitis agresivas^{110,119,120} y de fracasos por periimplantitis^{118,121}. Al igual que con *Enterococcus faecalis*, pese a no ser periodontopatógeno, su presencia aumenta en periodontitis refractarias al tratamiento¹¹².

1.3.9 Género *Bacillus*

Conjunto de bacterias Gram positivas, en forma de bastón, generalmente consideradas como comensales o saprófitas, frecuentemente encontradas como contaminante en el suelo o los alimentos¹²². En la cavidad oral, destaca la presencia de *Bacillus subtilis* como microbiota transitoria no patógena u oportunista. Se asocia en este grupo con otros microorganismos bajo el nombre de antracoides¹²³. Se aísla frecuentemente como contaminante ambiental tras la actividad diaria de una clínica dental siendo de los microorganismos más frecuentes junto a *Staphylococcus epidermidis* o *Streptococcus viridans*⁹³.

1.3.10 Género *Micrococcus*

El género *Micrococcus* pertenece al filo de las actinobacterias. Son bacterias Gram positivas, esféricas, habitualmente organizadas en tétradas o racimos con un tamaño entre 0,5 y 3 μm ⁸⁴. La producción de pigmentos carotenoides, confiere a las colonias de *Micrococcus luteus* un típico color amarillo.

Micrococcus luteus es un organismo comensal o saprofítico, aunque podría ser también un patógeno oportunista, particularmente en pacientes inmunodeprimidos¹²⁴. Además está considerado como un frecuente contaminante ambiental. De hecho, en un estudio de O'Donnell et al., *Micrococcus luteus* era el microorganismo más frecuentemente encontrado en las jeringas de aire- agua de equipos dentales como contaminante ambiental, posible agente causal de infecciones cruzadas entre pacientes¹²⁵ o en instrumental operatorio en contacto con la piel.

En la cavidad oral se ha descrito su presencia formando parte de la placa supragingival de superficies lisas en etapas iniciales. Diferentes irrigantes empleados en endodoncia (hipoclorito de sodio, clorhexidina o povidona yodada) son eficaces en la inhibición del 100% de las colonias de *Micrococcus luteus* sembradas *in vitro*¹²⁶.

1.4 Flora oral y caries

La caries dental es una enfermedad infecciosa, multifactorial, con elevada prevalencia en niños¹²⁷, adultos¹²⁸ y mayores¹²⁹, de naturaleza crónica, transmisible, compleja, multifactorial, caracterizada por la desmineralización y posterior desintegración molecular, localizada y progresiva de los tejidos del diente provocada por la digestión de los nutrientes realizada por las bacterias de la cavidad oral formadoras de ácidos^{130,131}. Se asocia a un déficit de las medidas preventivas de higiene oral.

Basados en estudios experimentales, Fitzgerald y Keyes¹³² propusieron que la caries se debía a la acción de *Streptococcus mutans*, microorganismo específicamente asociado a la caries según los postulados de Koch- Henle vigentes en 1960, que asociados a una serie de moduladores internos y externos provocan un cambio en la microbiota ecológica que desencadena una alteración del pH del medio oral, generando un medio específico para bacterias acidófilas y acidúricas.

Actualmente se confirma que hay asociación con valor predictivo entre la caries dental y *Streptococcus mutans*, aunque no con valor etiológico pues puede aislarse esta bacteria en bocas libres de caries y desarrollarse caries sin su presencia. La situación etiológica actual de la caries está basada en este paradigma de Fejerskov^{133,134}. De hecho, tras técnicas manuales atraumáticas de remoción de caries, los recuentos de *Streptococcus* y *Lactobacillus* disminuyen aunque no desaparecen por completo¹³⁵ y en lesiones cariosas en las que no se elimina por completo la dentina

cariada y se sellan de manera provisional con hidróxido de calcio, se consigue detener el avance de la caries, remineralizar la superficie y reducir significativamente las colonias de cepas cariogénicas¹³⁶. Hay otras bases cavitarias que, colocadas sobre dentina cariada, han logrado eliminar la presencia de bacterias, como el Agregado Trióxido Mineral (MTA) o cementos a base de hidroxiapatita¹³⁷.

Los microorganismos se pueden dividir en dos grupos, aquellos que participan en el desarrollo inicial de la enfermedad (*Streptococcus mutans* o *Streptococcus sobrinus*) y los que intervienen en su progresión (*Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Candida albicans*)¹³⁸. Según el tipo o la localización de la caries hay mayor asociación con unos tipos de bacterias que con otras (Tabla 1).

Tipo de caries	Especies bacterianas prevalentes
Superficies libres	<i>Streptococcus mutans</i>
Puntos y fisuras	<i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Superficies proximales	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Veillonella</i> .
Caries de dentina cerrada al medio oral	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces spp.</i>
Caries de dentina abierta al medio oral	<i>Actinomyces</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Caries radicular	<i>Actinomyces</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Capnocytophaga</i>
Caries de biberón	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Veillonella</i>
Caries rampante	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus mutans</i>
Recidivas de caries	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>

Tabla 1: Bacterias más frecuentemente localizadas según la localización o el tipo de caries^{139,140,141,142}.

1.5 Flora oral y patología pulpo- periapical

La base del conocimiento de la relación de microorganismos con la enfermedad pulpar se debe a estudios de Miller, quien en 1894 fue el primero en asociarlos¹⁴³. En 1965, Kakehashi et al.¹⁴⁴ establecieron una relación causa- efecto entre ciertos microorganismos y la infección pulpar. A partir de los estudios de Byström y Sundqvist publicados en 1981¹⁴⁵, se sabe que la mayoría de microorganismos aislados en pulpas necróticas son anaerobios, con mayoría de *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* y *Bacteroides*. Esos microorganismos no desaparecen completamente con el tratamiento quimiomecánico de conductos. Actualmente, la tasa de anaerobios estrictos se cifra por encima del 90% en pulpas necróticas sin caries y por debajo del 70% en dientes cariados^{146,147}.

Según la causa que provoque la colonización bacteriana de la pulpa, la composición de la microbiota será diferente; si la comunicación con la cavidad oral se debe a una gran caries o un traumatismo, las cepas más frecuentes son *Streptococcus* del grupo viridans y *Lactobacillus*; si se infecta a través de los tubulillos dentinarios desde una caries, las bacterias más habituales son las mismas que se aíslan en la caries (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Actinomyces naeslundii*...); si acceden a la pulpa desde una bolsa periodontal, la comunicación se realiza por el foramen apical o por conductos laterales, y las cepas encontradas en la pulpa no tienen relación con las de la bolsa periodontal, aislándose *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* o *Rothia dentocariosa*; en caso de infecciones por contigüidad, debidas a infecciones

apicales de dientes adyacentes, quistes apicales, o alteraciones óseas como osteítis u osteomielitis, las bacterias localizadas serán las mismas que las causantes del cuadro original; por último, la pulpa puede infectarse por anacoresis¹⁴⁸, como sucede en los casos de traumatismos dentales¹⁴⁹, asociada a un cuadro inflamatorio pulpar que incapacita a los mecanismos de defensa y permite la colonización de los microorganismos presentes en el torrente sanguíneo.

La composición bacteriana de la pulpa depende de su vitalidad¹⁵⁰. Estos microorganismos tienen la particularidad de asociarse formando una relación simbiótica que aumenta su virulencia¹⁵¹. En casos de infecciones de origen endodóntico pueden llegar a aislarse más de 40 especies bacterianas, siendo *Enterococcus faecalis*^{152,153}, *Lactobacillus*¹⁵⁴, *Actinomyces*¹⁵⁵ y *Porphyromonas gingivalis* las más frecuentes¹⁵⁶. En casos de infecciones endodónticas secundarias, la presencia de *Enterococcus faecalis* se vuelve aún más importante^{157,158,159}, variando según los distintos estudios entre un 22 y 77%^{160,161}. Sin embargo, en estas infecciones la flora es mixta, compuesta por microorganismos de distintos géneros (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, o *Lactobacillus*)¹⁶². Para los dientes multirradiculares la composición bacteriana es similar en infecciones primarias; no parece ser así en las secundarias, en las que la diversidad es mayor entre raíces¹⁶³. En pulpas necróticas de dientes deciduos, la composición microbiológica parece igualmente dominada por microorganismos anaerobios y *Streptococcus*¹⁶⁴.

1.6 Agentes antimicrobianos en operatoria dental

El interior de una cavidad recién preparada presenta un pH entre 4,5 y 5,5; constituyendo un hábitat adecuado para la supervivencia y proliferación de bacterias acidogénicas y acidúricas. Por lo tanto, es necesario realizar una limpieza que promueva no solo el arrastre de detritos, sino también la eliminación de microorganismos de dicha cavidad. Existen diferentes materiales para llevar a cabo la desinfección previa a la obturación, como son el digluconato de clorhexidina al 2%, las soluciones acuosas de hidróxido de calcio, los geles de fluoruro de sodio al 2% o de flúor- fosfato acidulado, el peróxido de hidrógeno al 3% (aunque puede alterar el curado de materiales fotopolimerizables), el hipoclorito de sodio al 5% (concentración similar a la empleada en los tratamientos de conductos) o la más novedosa ozonoterapia¹⁶⁵ (que no ha demostrado un efecto superior al de adhesivos autograbantes).

2. ADHESIÓN

2.1 Fundamentos, evolución y técnicas clínicas

La adhesión es una propiedad de la materia por la que dos superficies de diferente naturaleza química se mantienen unidas por fuerzas de atracción interfacial intermoleculares¹⁶⁶. La adhesión puede ser mecánica (trabazón), química o una combinación de ambas. El objetivo primordial de una restauración adherida es lograr una unión íntima entre el material restaurador y el sustrato dentario¹⁶⁷. Desde los primeros experimentos de Buonocuore en 1955¹⁶⁸ para la mejora de la unión de una resina acrílica al esmalte empleando grabado con ácido fosfórico al 85%, muchos han sido los avances en busca de un sistema adhesivo capaz de sellar la interfase con el sustrato dentario minimizando los efectos adversos de desajuste marginal, pérdida de retención de los materiales, discoloraciones de los márgenes de las restauraciones, sensibilidad postoperatoria, etc.

Se describen dos métodos diferentes en la interacción entre los materiales adhesivos y el sustrato esmalte/dentina. En primer lugar, se puede realizar la eliminación del barrillo dentinario generado en el tallado de la cavidad operatoria¹⁶⁹ con la técnica de grabado ácido total. A pesar de ser permeable al paso de fluidos, dicho barrillo disminuye la permeabilidad dentinaria¹⁷⁰. En segundo lugar, este barrillo se puede conservar, modificar e incorporar el barrillo en la interfase adhesiva con la técnica de autograbado¹⁷¹. La diferencia por tanto se asocia al empleo de un gel ácido, generalmente ácido ortofosfórico al 35-37%, que es posteriormente eliminado con

agua en la técnica de grabado total, descrita inicialmente por Fusayama en 1981, en la que se aplicaba el mismo ácido sobre esmalte y sobre dentina. Tras ello, se emplea una mezcla de monómeros disueltos en un solvente orgánico que ocupa los espacios entre las fibras de colágeno dejados tras la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita, formando un tejido mixto compuesto por colágeno, resina, hidroxiapatita residual y agua descrita en 1982 por Nakabayashi¹⁷² conocido como capa híbrida. La técnica de autograbado se basa en la simplificación y disminución de tiempo de clínica¹⁷³. El monómero ácido va incluido en el imprimador y no es eliminado con agua sino soplado con aire para eliminar el exceso de solvente. Este monómero disuelve parcialmente el barrillo dentinario y la hidroxiapatita incluyéndolos en la capa híbrida^{174,175}, estableciéndose entre ambos puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals¹⁷⁶. Los adhesivos autograbantes, por su mayor sencillez clínica, se están anteponiendo a los de grabado total, especialmente en aquellas situaciones en las que la dentina es el mayor sustrato, ya que sobre esmalte han mostrado unas tasas de desmineralización mucho menores a las de los adhesivos no autograbantes^{177,178}. Ambas técnicas se conjugan para diseñar el tercer método adhesivo, denominado técnica de grabado selectivo. Se aplica en aquellas situaciones clínicas en las que están involucrados los dos sustratos, esmalte y dentina. Consiste en realizar un acondicionamiento ácido convencional sobre el esmalte, seguido de la aplicación de adhesivos autograbantes sobre la preparación (esmalte y dentina) para combinar las ventajas de ambos sistemas.

Desde hace más de 50 años se ha estudiado la presencia de bacterias en el barrillo dentinario^{179,180}, ya fuera tras tratamientos de endodoncia o tras preparaciones

cavitarias. Inicialmente se consideraba que el grabado ácido de la dentina, eliminando el barrillo, conseguía aumentar la permeabilidad y humedad dentinaria, facilitando la unión de las resinas hidrofílicas tanto a la dentina peritubular como a la intertubular, logrando un mejor sellado de la interfase que prevenía de la microfiltración bacteriana¹⁷⁰, posible cofactor etiológico de daño pulpar¹⁸¹. Sin embargo, algunos autores sugirieron que la propia presencia del barrillo dentinario era capaz de sellar y bloquear el acceso de bacterias al sistema de tubulillos dentinarios^{182,183}, disminuyendo la penetración bacteriana en estudios *in vitro*. Estudios posteriores no hallaron diferencias entre eliminar o conservar el barrillo (Saleh et al.¹⁸⁴) o incluso demostraron que la eliminación del barrillo dentinario lograba reducir la filtración bacteriana (Clark- Holke et al.¹⁸⁵), disminuir la adherencia a la dentina (Yang et al.¹⁸⁶), aumentar el efecto antimicrobiano de los adhesivos (Orstavik et al.¹⁸⁷) y prevenir la formación de caries secundarias radiculares (Al- Helal et al.¹⁸⁸).

Además de por el efecto sobre los tejidos dentarios, los sistemas adhesivos se clasifican en función del número de pasos clínicos que hay que llevar a cabo. Para la técnica de grabado ácido total, puede haber sistemas de dos o tres pasos en función de si imprimador/ primer y adhesivo/ bonding se hallan en botes separados o en uno común. Para el autograbado, los sistemas se clasifican en uno o dos pasos, siendo los de un paso los que incluyen todos los componentes en un solo bote minimizando el tiempo clínico y el riesgo de incorporación de errores inherentes a la técnica.

2.2 Actividad antimicrobiana de los materiales restauradores

La capacidad antibacteriana de los materiales restauradores es una asignatura pendiente de la odontología a día de hoy. Las resinas compuestas no cuentan con ninguna capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano⁵, mientras que las resinas modificadas con poliácidos y los vidrios modificados con resinas compuestas presentan valores similares o incluso mejores que los de los adhesivos dentinarios^{5,6,8}. Existen además combinaciones experimentales de nanocomposites con diacetato de clorhexidina al 10%, que logran una mayor actividad bactericida, una menor reducción en el pH, así como una disminución en la capacidad de formar ácido láctico o colonias bacterianas de *Streptococcus mutans*¹⁸⁹. En los últimos años, se han diseñado prototipos de cementos de vidrio ionómero (CVI) modificados para mejorar sus propiedades físicas y/ o antibacterianas. En una de ellas, combinan el polvo del CVI con una mezcla de antibióticos compuesta por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina al 1'5% que inhibe el crecimiento de los gérmenes cariogénicos y mantiene unas adecuadas características físicas (resistencia compresiva y traccional)¹⁹⁰. En otro ensayo, han modificado su composición añadiéndole furanona, logrando un mayor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*¹⁹¹. Otras combinaciones que han demostrado mejorar la acción antimicrobiana de los CVI sin afectar o incluso mejorando sus propiedades físicas son las nanopartículas de dióxido de titanio al 3%¹⁹², las sales de amonio cuaternario¹⁹³ o el diacetato de clorhexidina o la cetrimida al 2'5%¹⁹⁴. El diacetato de clorhexidina, al 7,5%, también logra mejorar la actividad antimicrobiana de los materiales de obturación provisional frente a *Streptococcus mutans* sin menoscabo de sus propiedades mecánicas¹⁹⁵.

Los sistemas adhesivos deben ser capaces de inhibir o limitar la proliferación bacteriana en los gaps existentes en la interfase adhesiva, prolongando la vida útil de las restauraciones. Algunos adhesivos actuales han demostrado inhibir por sí mismos el crecimiento de los principales gérmenes causantes de caries, además de disminuir la invasión bacteriana en los túbulos dentinarios¹⁹⁶. Los adhesivos autograbantes presentan como supuesta ventaja frente a los sistemas clásicos de grabado total la conservación del barrillo dentinario incluyéndolo en la interfase adhesiva^{197,198}, lo cual parece asociado a una reducción de la sensibilidad postoperatoria¹⁹⁹. Cehreli²⁰⁰ demostró que los adhesivos autograbantes eran más eficaces inhibiendo a los principales gérmenes causantes de la caries mejor que la clorhexidina al 0,2%. Para algunos autores, la capacidad antimicrobiana de los adhesivos autograbantes radica en su pH ácido y en la sensibilidad de las bacterias a un medio con un pH bajo²⁰¹. Sin embargo, otros descartaron esta teoría, no encontrando diferencias significativas entre la acidez de la sustancia y su capacidad antimicrobiana, así como presentando un imprimador experimental con clorhexidina más eficaz que cualquiera de los sistemas empleados²⁰². Recientemente se ha demostrado que la fotopolimerización de los sistemas adhesivos reduce significativamente la actividad antibacteriana de los adhesivos autograbantes^{202,203,204}.

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas adhesivos con componentes antimicrobianos experimentales, que incluso han llegado a ser comercializados. Kazuno et al.²⁰⁵ evaluaron la eficacia de un sistema que incorporase en su composición lípidos anfifílicos, comprobando su mayor actividad antibacteriana.

Sin embargo, hallaron una deficiente adhesión a dentina que limita su uso como adhesivo exclusivo para el esmalte. En los trabajos de Xiao²⁰⁶, Li²⁰⁷ y Chiai²⁰⁸ se estudió la actividad antimicrobiana de un sistema adhesivo que incorporase el monómero antibacteriano DMAE-CB (cloruro de amonio metacriloetilacetildimetilo) al 3% frente a *Streptococcus mutans*, encontrando gran capacidad de inhibición del crecimiento, incluso a los 180 días, sin alterar la fuerza de unión con el tejido dentario. Su efecto actúa además sobre la adherencia y la integridad de la membrana bacteriana.

Se han realizado estudios incorporando a los adhesivos partículas de metacrilato de zinc, logrando un eficaz efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* en porcentajes entre el 10 y el 30%²⁰⁹ con una baja citotoxicidad; añadir nanopartículas de óxido de titanio parece favorecer la formación espontánea de hidroxiapatita cuando se incorporan por encima del 20%²¹⁰; con nanopartículas de plata²¹¹; con el antioxidante de origen natural epigallocatequina-3-gallato (EGCG), que a concentraciones de 200- 300 µg/ml logra no solo reducir el crecimiento de bacterias cariogénicas sino además incrementar la fuerza de unión con la dentina sin alterar el grado de conversión²¹²; o con el polisacárido de origen natural chitosán, que añadido al 0,12% incrementa el efecto antibacteriano sin afectar a las propiedades físicas de los adhesivos²¹³.

El sistema adhesivo modificado que ha adquirido mayor importancia clínica y los mejores resultados antibacterianos es el comercializado Clearfil Protect Bond® (Kuraray Co., Tokio, Japón), que cuenta en su composición con un 5% del monómero antibacteriano MDPB (bromuro de 12- metacriloxidodecilpiridinio). El grupo piridinio,

con carga positiva, es capaz de provocar un fenómeno de bacteriolisis por destrucción de la membrana celular. La incorporación de MDPB a adhesivos y/ o resinas compuestas²¹⁴ parece ser capaz de controlar o limitar la formación de caries secundarias *in vitro*²¹⁵. En los ensayos piloto, a una concentración del 2,5%, Imazato et al. demostraron gran actividad frente a *Streptococcus mutans*, además de una fuerza de unión a la dentina y un grado de conversión similares a los del adhesivo sin el monómero MDPB²¹⁶. La fuerza de unión a dentina cariada no solo depende del tipo de adhesivo empleado sino también de la técnica de eliminación de caries²¹⁷. Pese a que su adhesión a esta dentina es de menor fuerza²¹⁸, su buena estabilidad en el sellado marginal^{219,220}, unos valores de microfiltración similares a los de otros adhesivos^{221,222,223} y otros materiales de restauración como cementos de vidrio ionómero o resinosos²²⁴ y su gran capacidad antimicrobiana frente a los gérmenes de la caries (*Streptococcus mutans*^{165,225,226,227}, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* o *Actinomyces naeslundii*^{203,228,229}) hacen que sea capaz de inhibir la progresión de caries^{230,231,232}. Su efecto es mayor que el de otros desinfectantes cavitarios como la clorhexidina²³³, el cloruro de benzalconio o el peróxido de hidrógeno²³⁴ o que otros sistemas adhesivos autograbantes^{203,207,225,233,235} o adhesivos modificados con fluoruros²³⁶. No hay diferencias con otros adhesivos en la resistencia a la tracción *in vivo*²³⁷ garantizando un sellado adecuado. Su efecto parece debido a la creación de una zona de inhibición ácida en la dentina²³⁸.

Comparado con otros adhesivos autograbantes en la capacidad de inhibición de *Streptococcus* orales, Clearfil Protect Bond® fue el más efectivo²³⁹, además de presentar menor grado de desmineralización del esmalte en modelos dentales

simulados^{240,241}. Sin embargo, al comparar el efecto anticariogénico en estos modelos dentales simulados, los adhesivos con fluoruros (como Adper Prompt®) fueron más eficaces tanto en esmalte como en dentina que los adhesivos con MDPB²⁴². Sin embargo, Giammanco et al. no encontraron diferencias entre Clearfil Protect Bond® y un adhesivo autograbante convencional (Clearfil SE®) en la capacidad inhibitoria del crecimiento de gérmenes no cariogénicos como *Enterococcus faecalis*²⁴³.

Dentro del campo de la ortodoncia también existe el claro objetivo de controlar el riesgo de desmineralización dentaria de los pacientes con aparatología fija, reduciendo la posibilidad de lesiones de mancha blanca y caries dentinaria²⁴⁴. En diversos estudios, se ha buscado conocer la eficacia antibacteriana de sistemas adhesivos autograbantes modificados en su composición, ya sea con cloruro de cetilpiridinio al 2,5% (Al- Musallam et al.²⁴⁵), con el monómero antibacteriano 12-bromuro de metacriloloxidodecilpiridinio (MDPB) al 5% (Arhun et al.²⁴⁶), con cloruro de benzalconio añadido a adhesivos de tipo 4- META al 0,25- 0,75% (Saito et al.²⁴⁷) o con óxido de zinc al 23,1% añadido a resinas modificadas con vidrio ionómero (Spencer et al.²⁴⁸). El empleo de Clearfil Protect Bond® para el cementado de brackets ortodóncicos, presenta menores tasas de desmineralización del esmalte que otros adhesivos convencionales^{249,250,251}, aunque no hay una menor tasa de microfiltración que con técnicas de grabado total, láser KTP o clorhexidina^{252,253,254}. Además, la resistencia al cizallamiento fue mucho menor que con otros adhesivos²⁵⁵. En estudios *in vivo*, el cementado de brackets con este adhesivo confirmó los datos previos, generando una mayor tasa de despegamiento sin encontrarse diferencias en el acúmulo de placa o la desmineralización periférica²⁵⁶.

Dentro del campo de la endodoncia, los materiales de obturación empleados tampoco poseen un marcado efecto antibacteriano, aunque esto se consigue mediante los irrigantes empleados para la desinfección del sistema de conductos. Son múltiples los estudios existentes respecto a su capacidad de inhibición frente a microorganismos, siendo la clorhexidina al 2%, ya sea en forma líquida o en gel, una solución más eficaz que el hidróxido de calcio combinado o no con clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*^{257,258,259}, o que el hipoclorito de sodio al 5,25% manteniendo un menor número de colonias cuando se evaluaba a las 48 horas²⁶⁰ o a los 7 días^{261,262}, disminuyendo la adherencia de bacterias a los túbulos dentinarios¹⁸⁶. El hipoclorito sódico al 4,2% demostró ser más eficaz cuanto más ácido era su pH, aunque en ninguno de sus formulaciones logran inhibir al 100% el crecimiento de *Enterococcus faecalis*²⁶³, a pesar de que el pH bactericida para esta bacteria se establece desde 11,5²⁶⁴. Sassone et al. establecieron como concentraciones mínimas para presentar actividad antimicrobiana la clorhexidina al 0,5 ó 1% o el hipoclorito sódico al 1 ó 5%²⁶⁵.

3. TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

3.1 Medio de cultivo: Concepto y tipos

Se considera como medio de cultivo a una solución equilibrada de los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo y multiplicación de microorganismos en laboratorio²⁶⁶. El número de medios es amplio debido a la amplia diversidad metabólica de gérmenes. Estos medios de cultivo deben contener nutrientes para las cepas analizadas, poseer valores adecuados de humedad y pH y tener la capacidad de estar inicialmente estériles.

Los medios pueden ser clasificados en base a distintos factores, entre ellos su estado físico (sólidos, líquidos o semisólidos), su origen (naturales, sintéticos o semisintéticos) o su utilidad microbiológica (comunes, enriquecidos, selectivos, diferenciales, de transporte o específicos).

El medio de cultivo estándar en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de difusión o microdilución en agar es el caldo Cerebro- Corazón (BHI). Además, se describen muchos otros medios para las técnicas de difusión o microdilución en agar, como el medio Mueller- Hinton (MH)^{209,236,259,265}, el tripticasa- soya (TSA)^{5,233} o el Sabouraud- dextrosa en aquellos estudios en los que se evalúan levaduras. Algunos estudios de sensibilidad antibacteriana emplean otros medios de cultivo menos frecuentes como el agar Schaedler⁴, el agar sangre Columbia^{165,227}, el agar CASO (agar

peptona de caseína-peptona de harina de soja)²²⁸, el Luria Bertani (LB)²¹⁰ o el mitis salivarius²²⁹. El caldo agar cerebro- corazón, comúnmente conocido por sus siglas en inglés (Brain Heart Infusion, BHI), es una modificación de los caldos de Rosenow²⁶⁷ y Hayden²⁶⁸ en los que se adicionó infusión de cerebro de ternera y difosfato de sodio. El medio BHI está especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. También es recomendado por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS)²⁶⁹ para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana como medio estándar de control de calidad. Se trata de un medio sólido, con pH ligeramente básico (7,4 +/- 0,2 a 25°C), rico en nutrientes, apto para el cultivo de muchas cepas de bacterias, hongos o levaduras. Su origen animal a base de corazón y cerebro de ganado vacuno le provee de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. El agente solidificante es el agar (10%).

Algunas especies bacterianas, por sus especiales características metabólicas, presentan un notable crecimiento cuando son sembradas en medios de cultivo específicos. Los *Lactobacillus*, microorganismos acidófilos, crecen mejor en un medio con un pH más ácido. McLaughlin²⁷⁰ describió un método específico para *Lactobacillus* ya en 1946, denominándolo agar azúcar tripticasa (pH= 6). Posteriormente, en 1960, a partir de los nombres de sus tres descubridores, de Man, Rogosa y Sharpe²⁷¹, aparece un nuevo medio específico para *Lactobacillus*, conocido como MRS (pH= 6,4 +/- 0,2). Presenta la especial peculiaridad de necesitar condiciones de aerobiosis con 5- 10% de dióxido de carbono (CO₂) durante la incubación de los microorganismos. Este medio se ha mantenido como el específico y de preferencia para estudios microbiológicos en los

que estén implicadas cepas de bacterias ácido lácticas del tipo *Lactobacillus*. De hecho, es un medio muy frecuentemente empleado en la identificación de bifidobacterias en la industria alimentaria²⁷².

3.2 Pruebas de sensibilidad *in vitro* a agentes antimicrobianos

El objetivo de estas pruebas es lograr a través de una evaluación *in vitro* la probabilidad de tratar con éxito las infecciones mediante el empleo de un antimicrobiano específico y prevenir posibles resistencias²⁷³. Se describen diversos métodos para cuantificar dicha actividad antibacteriana, como la difusión en agar, las técnicas de microdilución, las pruebas de e-test, las pruebas de contacto directo, los recuentos de colonias supervivientes o aquellas que determinan los niveles de marcadores metabólicos como consecuencia de la inhibición de microorganismos.

El método de difusión en agar fue estandarizado por Bauer, Kirby et al. en 1966²⁷⁴. Es la prueba de susceptibilidad más ampliamente empleada en bacteriología clínica. Sus resultados son bastante exactos, además de tratarse de un método estandarizado, sencillo, rápido, económico y fácilmente reproducible. Consiste en colocar el antimicrobiano sobre unos discos de papel que igualmente deben reunir una serie de requisitos, como son un diámetro entre 5 y 7 mm, un espesor de 0,02 mm, cargados con una cantidad justa y repetible de antimicrobiano para que los resultados sean comparables, así como estar conservados a menos de 4°C²⁷³.

A partir de un cultivo de los diferentes microorganismos a analizar, se toman cuatro o cinco colonias que se incuban durante 2 a 5 horas hasta obtener una turbidez equivalente visualmente a 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ ml). Tras llevar el medio de cultivo elegido a las placas Petri, en un espesor controlado de 4 mm, se siembra la cepa de análisis en una cantidad constante.

La técnica de difusión en agar es un método ampliamente validado para diferenciar la actividad antibacteriana entre distintos materiales; sin embargo, no sirve para realizar mediciones a largo plazo. Un método similar es la microdilución en tubo, en la que los productos a testar se integran en los tubos de cultivo junto con el inóculo y se analiza la turbidez o la densidad óptica del medio por espectrofotometría^{191,192,193,263}. Tanto las pruebas de difusión en agar como las de microdilución no permiten saber si el antimicrobiano evaluado es bactericida o bacteriostático, solo que inhiben el crecimiento bacteriano. Para conocer las dosis necesarias para obtener un producto bactericida necesitamos realizar pruebas de determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida (CMI/ CMB) de cada material para cada uno de los microorganismos²⁰². El valor de CMI se define como la menor cantidad del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo²⁷⁵. Suele ser suficiente para establecer la concentración del antimicrobiano necesaria para controlar una infección, dejando al sistema inmune la misión de eliminar al agente invasor²⁷³. Para el cálculo de la CMI se prepara un gradiente de concentración del antimicrobiano a evaluar y se enfrenta a una cantidad constante de inóculo bacteriano, ya sea mediante microdilución o con la técnica de difusión en placas, siempre manteniendo una cantidad constante de antimicrobiano y

de inóculo. Tras esperar a su tiempo de incubación bajo condiciones adecuadas de atmósfera y temperatura, se observan los pocillos o las placas para buscar la última dilución en la que se observa inhibición del crecimiento bacteriano. Esta última dilución corresponde con el valor de la CMI.

Otro método distinto de la técnica disco- placa o la microdilución para el cálculo de la CMI son las pruebas de E- test. Se trata de un método cuantitativo de difusión en agar, consistente en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio, formando unas elipses de inhibición alrededor de la tira. Tras la incubación, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento.

Otro de los métodos frecuentemente empleados es el recuento de colonias bacterianas (UFC/ml) tras el contacto directo de los materiales con la superficie a evaluar. Esta técnica sí permite evaluaciones a más largo plazo, incluyendo algunos estudios ensayos hasta 180 días.

Además de cuantificar el grado de supervivencia bacteriano, algunos tests analizan la actividad metabólica bacteriana tras la aplicación de un material, como la formación de biofilms o la producción de ácido láctico, para medir la eficacia en la inhibición del desarrollo de microorganismos^{189,211,231}.

Otros estudios tratan de comprobar la eficacia de los adhesivos bajo unas condiciones *in vitro* de alto riesgo de cariogenicidad, cuantificando el grado de desmineralización existente según el adhesivo evaluado²⁵⁵, la presencia de bacterias bajo análisis con microscopia electrónica de barrido (MEB^{184,212} o la filtración de microorganismos a través del material^{222,224}.

Los estudios *in vitro* con microorganismos suelen emplear bacterias provenientes de alguna colección estándar. Una de las más frecuentes por su extensión y aceptación internacional es la colección americana de cultivos (ATCC, American Type Culture Collection), aunque también hay otras colecciones extendidas como la NCTC (National Collection of Type Cultures, Reino Unido), la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemania) o la NCIB (National Collection of Industrial Bacteria, Escocia). En otros estudios se trabaja con muestras bacterianas de pacientes, que no están estandarizadas y no permiten controlar la presencia de mecanismos de resistencia o contaminación por otras líneas celulares, o con combinaciones de distintas bacterias agregadas en biofilms para simular situaciones clínicas.

—●HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Por razones evidentes, comentadas con anterioridad, sería deseable que los materiales de obturación, y los adhesivos en particular, tuvieran efecto antibacteriano. Los estudios realizados hasta el momento muestran una cierta capacidad antibacteriana de algunos sistemas adhesivos frente a algunos gérmenes, principalmente cariogénicos. Existen numerosos aspectos pendientes de investigar, entre ellos la capacidad antibacteriana de nuevos sistemas adhesivos sobre diferentes especies bacterianas y los factores que la determinan. Además, los diferentes métodos de estudio empleados en los trabajos publicados plantean dudas sobre la posibilidad de comparar los diferentes resultados.

Es razonable pensar que los nuevos adhesivos autograbantes tengan en alguna medida efecto antibacteriano, y que este efecto se produzca tanto sobre especies cariogénicas como no cariogénicas, aunque esto presumiblemente dependerá, por un lado, de la composición y características del adhesivo – y por lo tanto será diferente en función del adhesivo empleado-; y por otro lado, de la susceptibilidad específica de cada germen, por lo que el efecto antibacteriano será diferente para las distintas especies bacterianas presentes en el medio oral. También pensamos que diferentes métodos de estudio pueden arrojar resultados diferentes, en particular en lo relativo al método de medición del potencial antibacteriano.

La hipótesis nula que trataremos de contrastar es:

- Que no existen diferencias en la capacidad inhibitoria del crecimiento de ciertos microorganismos presentes en la cavidad oral, tanto cariogénicos como no cariogénicos, entre cinco adhesivos autograbantes, un adhesivo de grabado total y un antiséptico control.
- Que no existe correlación entre la acidez de los adhesivos y su capacidad inhibitoria.
- Que no hay diferencias entre dos métodos diferentes de medición del potencial antibacteriano.

—●OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar la capacidad inhibitoria de cinco adhesivos dentinarios autograbantes (Adhe SE One F®, Clearfil Protect Bond®, Futurabond DC®, G-Bond® y Xeno V®), uno no autograbante (Excite®) y clorhexidina al 2% frente al crecimiento de las siguientes cepas bacterianas de la cavidad oral: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii* y *Candida albicans*.
2. Comparar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de los adhesivos autograbantes citados frente al efecto de un adhesivo no autograbante y de un antiséptico control (clorhexidina).
3. Determinar la sensibilidad de los microorganismos empleados a la acción de cada uno de los productos evaluados.
4. Comparar el efecto inhibitorio generado por los adhesivos dentinarios y el antiséptico control sobre los microorganismos más frecuentemente asociados con el desarrollo de caries frente a otros microorganismos no cariogénicos presentes en la cavidad oral.

5. Comprobar si existe correlación entre el pH de los adhesivos empleados y su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano.
6. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada producto frente a cada una de las bacterias evaluadas.
7. Comprobar si existe correlación entre las dos pruebas de medición de la capacidad inhibitoria, CMI y difusión en agar.

————● MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL

Los materiales empleados para la realización de este trabajo han sido:

1. Adhesivos autograbantes:

1. Futurabond DC® (Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania)
2. Adhe SE One F® (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein)
3. Xeno V® (Dentsply, Konstanz, Alemania)
4. GC G- Bond® (GC Corporation, Tokyo, Japón)
5. Clearfil Protect Bond® (Kuraray Co, Tokyo, Japón) (Tabla 2)

2. Adhesivo no autograbante: Excite® (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein)

(Tabla 2).

3. Digluconato de clorhexidina al 2% (Productos químicos Manuel Riesgo SA, Madrid, España).

Adhesivo	Composición	Polimerización	pH (Fabricante)	Efecto sobre la dentina	Fabricante
Excite®	Bis- GMA: 25-50% Etanol: 10-25% Metacrilato de 2-hidroxietilo: 10-25% Acrilato de ácido fosfónico: 10-25% Dimetacrilato de uretano: 2,5-10%	Fotopolimerizable	2,5	Grabado total	Ivoclar Vivadent AG (Schaan, Liechtenstein)
Adhe SE One F®	Bis-metacrilamida dihidrogenofosfato: 5-25% Isopropanol: 5-15% Ácido acrilamidossulfónico: 1-10% Ácido acrilamido amino: 5- 20% Fluoruro potásico: < 1% Agua Dióxido de silicio Iniciadores y catalizadores	Fotopolimerizable	1,5	Auto-grabante	Ivoclar Vivadent AG (Schaan, Liechtenstein)
Xeno V®	Acrilatos bifuncionales Acrilatos ácidos Éster de ácido fosfórico Ácido acrílico Agua Butanol terciario Iniciador y estabilizador	Fotopolimerizable	1	Auto-grabante	Dentsply DeTrey (Konstanz, Alemania)
Clearfil Protect Bond®	Bisfenol A diglicidilmetacrilato: 25-45% 2-hidroxietil metacrilato: 20-40% Fluoruro sódico: <1% Bromuro de 12- metacriloxidodecilpiridinio (MDPB) 10-Metacriloxidocildihidrogenofosfato Dimetacrilato alifático hidrofóbico Sílice coloidal Canforoquinona Iniciadores y aceleradores	Fotopolimerizable	NR	Auto-grabante	Kuraray Co (Tokio, Japón)
Futurabond DC®	Monómero ácido adhesivo: 25- 50% Bis- GMA: 2,5-5% 2- hidroxietil metacrilato: 2,5- 5% Etanol: 25- 50% Iniciador: 2,5-5%	Dual	1,5	Auto-grabante	Voco GmbH (Cuxhaven, Alemania)
G- Bond®	Acetona/Propanona: 39% Agua: 20% 4- META: 13% UDMA: 9% Dimetacrilato: 9%	Fotopolimerizable	NR	Auto-grabante	GC Corp (Tokio, Japón)

Tabla 2: Sistemas adhesivos incluidos en el estudio: composición química, mecanismo de polimerización, pH, efecto sobre la dentina y fabricante.

4. **Cepas de la cavidad oral evaluadas** (Tabla 3): Las bacterias empleadas fueron seleccionadas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

1. *Escherichia coli* (ATCC 1995)
2. *Micrococcus luteus* (ATCC 4698)
3. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
4. *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1798)
5. *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
6. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
7. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29292)
8. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
9. *Lactobacillus casei* (ATCC 393)
10. *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224)
11. *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104)
12. *Candida albicans* (ATCC 18804).

	Familia	Metabolismo	Patogenia	Cavidad oral	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Anaerobio facultativo	Patógeno u oportunista, a nivel gastrointestinal.	Transeúnte u oportunista en enfermedad periodontal o infección de glándulas salivales	1995
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcaceae</i>	Aerobio facultativo	Comensal u oportunista en inmunosupresión.	Placa supragingival y microflora normal	4698
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Anaerobio facultativo	Patógeno primario.	Periodontitis agresiva, infección de glándulas salivales	6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Anaerobio facultativo	Microbiota normal y patógeno oportunista.	Patógeno oportunista en caries radicales, infecciones pulpares, gingivitis y periodontitis.	1798
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	Aerobio facultativo	Contaminante ambiental o alimenticio no patógeno.	Microbiota transitoria no patógena, probiótico.	6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	Aerobio estricto	Patógeno oportunista en inmunosupresión.	Periodontitis o periimplantitis refractarias	27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcaceae</i>	Anaerobio facultativo	Comensal, oportunista en inmunosupresión.	Periodontitis agresivas o refractarias y fracasos endodónticos	29292
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcaceae</i>	Anaerobio facultativo	Frecuente patógeno u oportunista vaginal, intestinal, dermatológico e incluso causante de endocarditis.	Principal agente causal de caries, gingivitis y periodontitis, abscesos periapicales, pulpitis, celulitis...	25175
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	Anaerobio facultativo heterofermentativo	Probiótico. Infecciones sistémicas como oportunista.	Desarrollo de caries en fases avanzadas; probiótico.	393
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	Anaerobio facultativo homofermentativo	Probiótico.	Desarrollo de caries en fases avanzadas; probiótico.	9224
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	Anaerobio estricto o facultativo	Causante de actinomicosis (infección oportunista y endógena).	Caries dentinaria, caries radicular, periodontitis.	12104
<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	Levadura aerobia facultativa fermentadora	Microflora normal. Oportunista en inmunosupresión.	Desarrollo de caries y candidiasis.	18804

Tabla 3: Identificación y caracterización de los microorganismos incluidos en el estudio.

5. Discos de sensibilidad de papel estériles BBL- Sensidisc® (BD Corporation, New Jersey, Estados Unidos) de 7 mm de diámetro y 1,5 mm de grosor.
6. Medios de cultivo Difco® (BD Corporation, New Jersey, Estados Unidos): agar BHI (Brain Heart Infussion) y agar MRS para las cepas de *Lactobacillus*.
7. Lámpara de fotopolimerización Elipar Free Light 2® (3M ESPE, Saint Paul, Estados Unidos).
8. Tiras de papel reactivas para pH 0,0- 6,0 Sigma® (Sigma- Aldrich Chemical Company, Saint Louis, Estados Unidos) con intervalos cada 0,5 puntos.
9. Espectrofotómetro Dinko Instruments D-101® (Dinko Instruments, Barcelona, España).
10. Estereomicroscopio Leica MZ12® (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).
11. Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 4500® (Nikon Corporation, Tokio, Japón).
12. Software analizador de imágenes Image Tool 3.0® (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Estados Unidos).

2. MÉTODO

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Odontología Conservadora, en colaboración con el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

2.1 Determinación de la sensibilidad bacteriana

Se prepararon un total de 840 muestras según la técnica de difusión en agar para medir el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano tras 48 horas de incubación bajo condiciones controladas de atmósfera y temperatura. Se diseñó una distribución en doce grupos, uno por cada cepa microbiológica analizada, de 70 unidades cada uno de ellos. Se emplearon 10 placas de Petri con cada uno de los productos evaluados para cada microorganismo, obteniendo el total de 840 muestras (Tabla 4).

Se prepararon placas de Petri con 15 ml de agar sobre las que se inocularon 100 microlitros de suspensión de los microorganismos según la escala 0,5 McFarland²⁷⁶ ($\approx 1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml), empleando como medio de cultivo la difusión en agar BHI (Brain Heart Infusion), salvo para las cepas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en las que se empleó el medio selectivo de De Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se realizó la distribución de la suspensión bacteriana con ayuda de un asa estéril bajo cámara de

aspiración y luz ultravioleta. Una vez realizada una distribución uniforme se dejaron secar las placas durante 1 hora antes de colocar los discos de sensibilidad.

Una vez secas, se les aplicó a cada una de ellas un único disco de papel de sensibilidad (SensiDisc®), lo más centrado posible, con la ayuda de unas pinzas estériles. A continuación, con una micropipeta, se saturaron los discos con 20 microlitros de los productos seleccionados: Futurabond DC® (Voco), Adhe SE One F® (Ivoclar Vivadent), Xeno V® (Dentsply Maillefer), GC G- Bond® (GC), Clearfil Protect Bond® (Kuraray), Excite® (Ivoclar Vivadent) como adhesivo dentinario de grabado total y digluconato de clorhexidina al 2% como control positivo. Todos los productos, salvo Futurabond DC® (Voco) y el digluconato de clorhexidina al 2% fueron sometidos a 10 segundos de fotopolimerización mediante la lámpara Elipar Free Light 2® (3M ESPE) bajo una intensidad de 1.000 mW/cm².

	Clearfil Protect Bond®	Adhe SE One F®	Xeno V®	G- Bond®	Futurabond DC®	Excite®	Clorhexidina 2%	TOTAL
<i>Bacillus subtilis</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Streptococcus mutans</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Cándida albicans</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Lactobacillus casei</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Escherichia coli</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
<i>Micrococcus luteus</i>	10	10	10	10	10	10	10	70
TOTAL	120	120	120	120	120	120	120	840

Tabla 4: Matriz de diseño: distribución de las muestras según las dos variables de estudio: cepa y producto.

Las condiciones de incubación fueron diferentes según el metabolismo de cada una de las cepas; *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* se incubaron en un medio rico en CO₂; *Streptococcus mutans* y *Actinomyces naeslundii* en anaerobiosis; y el resto en condiciones de aerobiosis. Se mantuvieron bajo control de temperatura a 37º C durante 48 horas. A continuación, se observaron los halos de inhibición existentes y se tomaron imágenes fotográficas bajo magnificación con el estereomicroscopio Leica MZ12® y la cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 4500®.

Se realizaron pruebas de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD600) con la ayuda de un espectrofotómetro de los distintos inóculos bacterianos empleados para confirmar el crecimiento adecuado de las cepas en los controles. Las concentraciones iniciales en UFC/ml se muestran en la Tabla 5.

Microorganismo	OD600	UFC/ml
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0,448	3,8*10 ⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	1,2	1,04*10 ⁸
<i>Candida albicans</i>	0,82	1,6*10 ⁸
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,911	8,4*10 ⁸
<i>Escherichia coli</i>	0,915	2,08*10 ⁸
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,635	2,9*10 ⁷
<i>Lactobacillus casei</i>	0,622	1,26*10 ⁷
<i>Micrococcus luteus</i>	1,28	2,6*10 ⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,89	3,12*10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,719	1,2*10 ⁸
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,875	2,8*10 ⁸
<i>Streptococcus mutans</i>	0,292	1,1*10 ⁸

Tabla 5: Concentraciones iniciales en UFC/ml de las doce cepas evaluadas para el cálculo de las CMI para cada producto.

Para la medición del diámetro del halo de inhibición sobre las imágenes obtenidas bajo magnificación empleamos el software Image Tool 3.0®. Se tomaron cuatro puntos de medición del radio del halo de modo aleatorio, obteniendo un valor medio para cada muestra, que fue duplicado para el cálculo del diámetro. Las mediciones de los halos fueron realizadas por un único observador.

La secuencia metodológica se resume en la Imagen 1.

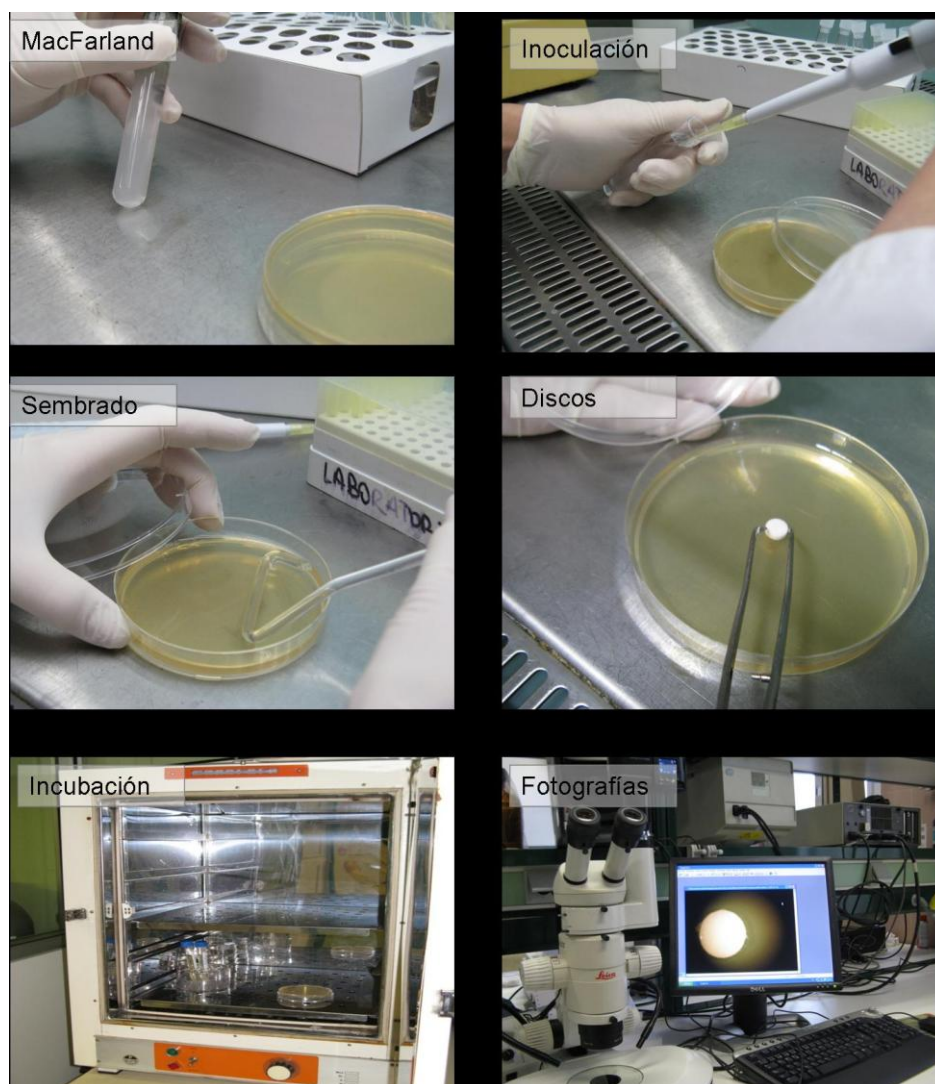


Imagen 1: Secuencia de laboratorio para la prueba de difusión en agar con discos de papel.

2.2 Determinación de pH

El pH de los distintos adhesivos fue analizado utilizando tiras de papel reactivas para pH (Sigma®) (Imagen 2). Se prepararon tres muestras de cada uno de los adhesivos, numeradas aleatoriamente, sobre las que se aplicaron 5 µl de cada producto. Las muestras fueron analizadas inmediatamente, sin someterlas a fotopolimerización, por duplicado, por un único observador ciego previamente formado en análisis de pH con tiras de papel reactivas. Las mediciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de luz y a temperatura ambiente. Los valores obtenidos fueron sometidos a pruebas de concordancia para corroborar la fiabilidad intraobservador. Se consideró válida una concordancia por encima del 95% para cada muestra. Una vez confirmada, se obtuvo el valor medio de las seis mediciones para cada uno de los adhesivos.

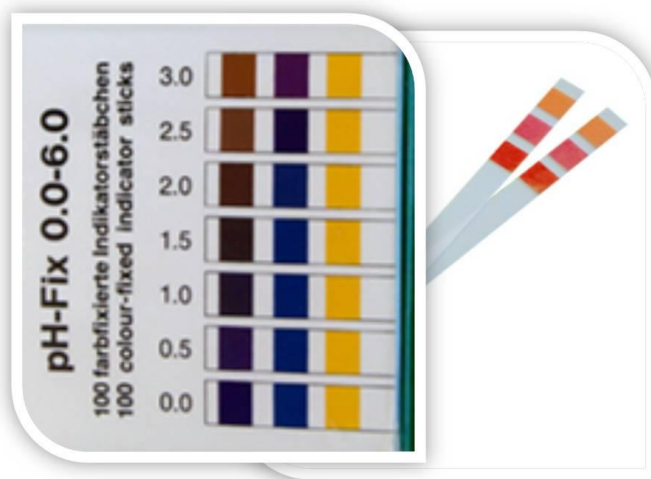


Imagen 2: Tiras de papel para medir el pH Sigma® y escala de colores con intervalos cada 0,5.

2.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

En tercer lugar se realizó el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada uno de los productos frente a los microorganismos analizados. Para ello se realizó una técnica de difusión en agar en las mismas condiciones que para el cálculo de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, salvo para el medio de cultivo. Siguiendo las directrices del EUCAST, se emplea como medio de cultivo el agar Mueller- Hinton. Los discos se cargan con los adhesivos evaluados en un gradiente de concentración. El disolvente elegido para reducir la concentración de los productos fue el agua destilada.

Las condiciones de tiempo, temperatura y atmósfera de incubación son iguales que en la valoración de los halos de inhibición. La mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo evaluado, CMI (mg/l), fue aquella en la que apareciera el halo más pequeño y que en la siguiente dilución no se produjese ningún halo.

2.4 Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico de los valores obtenidos se emplearon los servicios del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Estadística de la Universidad Complutense de Madrid utilizando el programa estadístico SPSS 20.0 (IBM, Nueva York, USA). Inicialmente se realizó una estadística descriptiva de los resultados obtenidos en cuanto a los halos de inhibición, obteniendo valores medios, de desviación estándar, así como máximos y mínimos. A continuación, se llevó a cabo la

estadística inferencias mediante el test de análisis de variancias (ANOVA) y tests *post-hoc* de Duncan para hallar la localización de las diferencias entre los grupos. Estas pruebas se realizaron tanto de manera bifactorial, agrupando todas las muestras y aislando la variable microorganismo (CEPA) o la variable adhesivo (PRODUCTO), como de manera unifactorial para cada uno de los microorganismos por separado frente a los siete productos empleados.

A continuación, se diseñó un subgrupo con los cuatro microorganismos más frecuentemente asociados con el desarrollo de caries (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* y *Actinomyces naeslundii*) y se analizó el efecto inhibitorio de los adhesivos sobre ellos, comparándolo con el efecto inhibitorio sobre el resto de las bacterias.

Por último, se realizaron pruebas de correlación de Spearman tanto entre los valores de pH obtenidos para los adhesivos y los halos de inhibición desarrollados, como entre los valores de Concentración Mínima Inhibitoria y los halos de inhibición con cada uno de los doce microorganismos y siete productos analizados.

Se estableció el nivel de significación estadística para todos los tests en un valor de $p < 0,05$.

————● RESULTADOS

RESULTADOS

1. GRÁFICO DE INTERACCIÓN CEPA- PRODUCTO

En el siguiente gráfico de interacción (Gráfico 1) aparecen representados los resultados de todos los productos frente a cada uno de los microorganismos evaluados. Cada una de las líneas de color representa a cada uno de los siete productos evaluados en nuestro trabajo. En el eje de ordenadas se muestran los valores medios del diámetro de inhibición para cada uno de los doce microorganismos repartidos en el eje de abscisas. La existencia de entrecruzamiento de las líneas así como la falta de paralelismo de las mismas indican la existencia de interacción entre las dos variables estudiadas (CEPA y PRODUCTO).

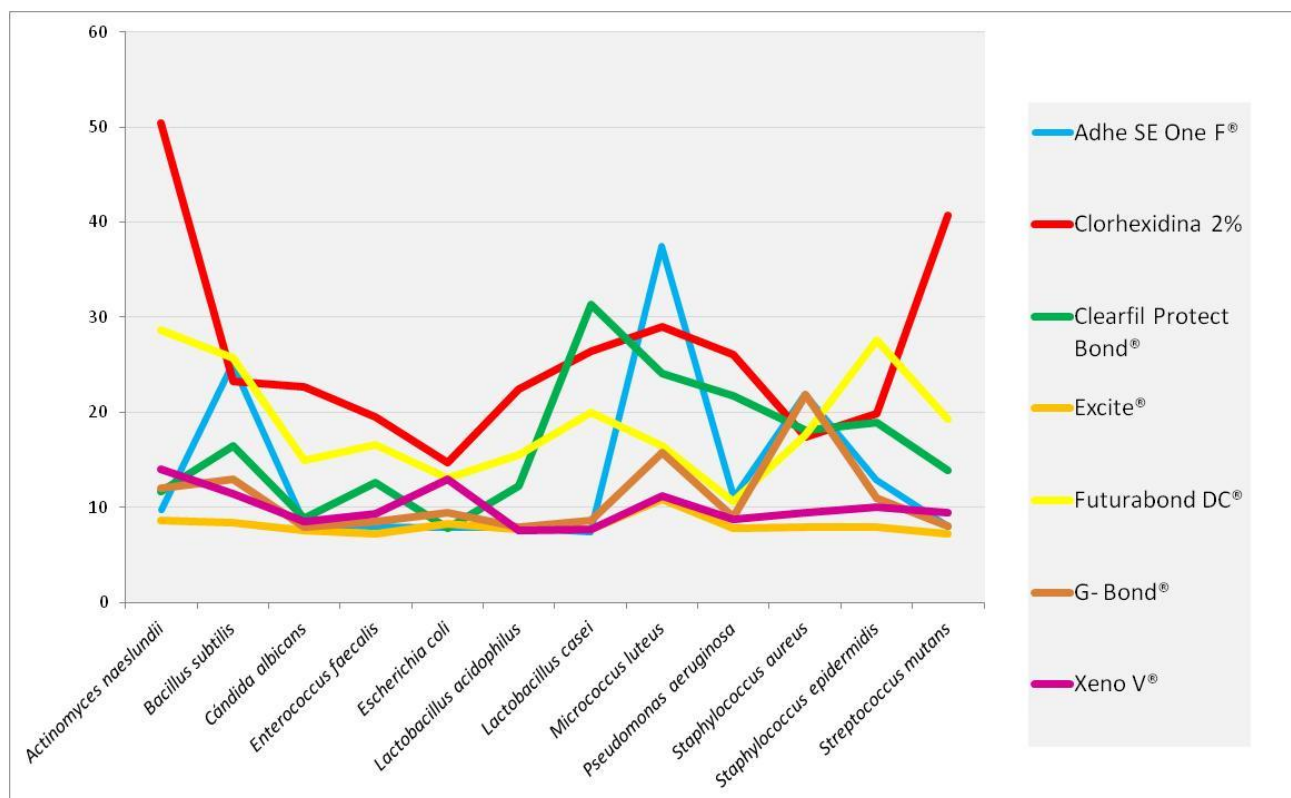


Gráfico 1: Gráfico de interacción de la muestra de estudio.

2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Con el objetivo de obtener la mayor potencia estadística posible agrupando la totalidad de las muestras ($n=840$) se realizó un test de ANOVA bifactorial. Siendo el diámetro del halo de inhibición (mm) la variable dependiente, ANOVA encontró un valor de $p<0,0001$ con las tres variables de análisis: los microorganismos (variable CEPA), los adhesivos dentinarios (variable PRODUCTO) y la relación entre ellos (variable CEPA*PRODUCTO) como variables independientes, indicando la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Tabla 6). A continuación, se realizaron tests *post-hoc* de Duncan para hallar la localización de dichas diferencias. En las tablas y gráficas de resultados para cada producto o cada microorganismo, aquellos grupos que tienen la misma letra- en las tablas- o el mismo color- en los diagramas de barras-, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre si.

Variable independiente	<i>p</i>
Cepa	< 0,0001
Producto	< 0,0001
Cepa * Producto	< 0,0001

Tabla 6: Valores de *p* tras ANOVA bifactorial para las variables CEPA, PRODUCTO y CEPA*PRODUCTO.

2.1 ANOVA Bifactorial y test de Duncan para la variable CEPA.

Referente a la variable PRODUCTO, se ordenan los microorganismos en base a su sensibilidad a la acción de los adhesivos empleados, siendo *Micrococcus luteus* la especie más sensible y *Escherichia coli* la menos sensible a la acción de los productos (Tabla 7, Gráfico 2).

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Micrococcus luteus</i>	70	20,6939	9,37	A
<i>Actinomyces naeslundii</i>	70	19,3128	14,4	B
<i>Bacillus subtilis</i>	70	17,6179	6,77	C
<i>Staphylococcus aureus</i>	70	16,3137	5,31	D
<i>Lactobacillus casei</i>	70	15,5666	9,63	E
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	70	15,43	6,71	E
<i>Streptococcus mutans</i>	70	15,2201	11,28	E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70	13,5652	6,89	F
<i>Enterococcus faecalis</i>	70	11,6805	4,53	G
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	70	11,6016	5,31	G
<i>Cándida albicans</i>	70	11,2185	5,31	G
<i>Escherichia coli</i>	70	10,5677	2,82	H

Tabla 7: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la variable CEPA.

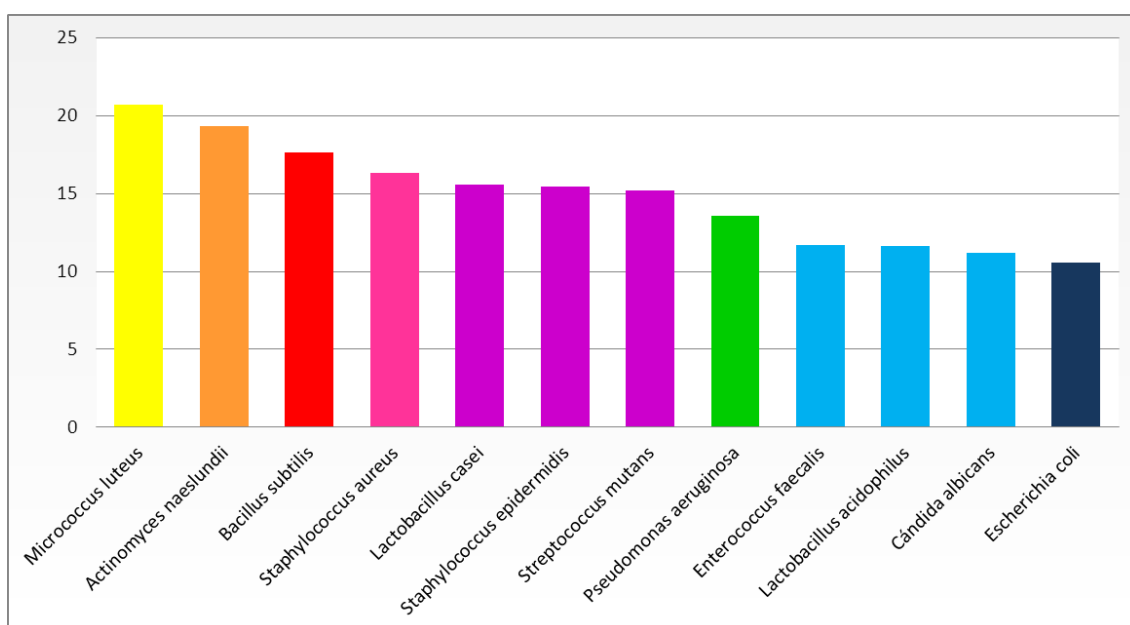


Gráfico 2: Test de Duncan tras ANOVA bifactorial para la variable CEPA.

2.2 ANOVA Bifactorial y test de Duncan para la variable PRODUCTO

Por lo que respecta a la variable CEPA, todos los productos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre si. En orden de mayor a menor capacidad inhibitoria, hallamos que la clorhexidina al 2% es el agente más potente, seguido del adhesivo autograbante de polimerización dual Futurabond DC®. A continuación, el adhesivo autograbante modificado con monómeros antibacterianos Clearfil Protect Bond®, seguidos de Adhe SE One F®, G- Bond®, Xeno V® y por último el adhesivo de grabado total Excite® (Tabla 8, Gráfico 3).

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	120	26,0298	9,91	A
Futurabond DC®	120	18,8368	5,7	B
Clearfil Protect Bond®	120	16,4704	6,73	C
Adhe SE One F®	120	13,7802	9,19	D
G- Bond®	120	11,0757	4,19	E
Xeno V®	120	10,0043	2,19	F
Excite®	120	8,0961	1,14	G

Tabla 8: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la variable PRODUCTO.

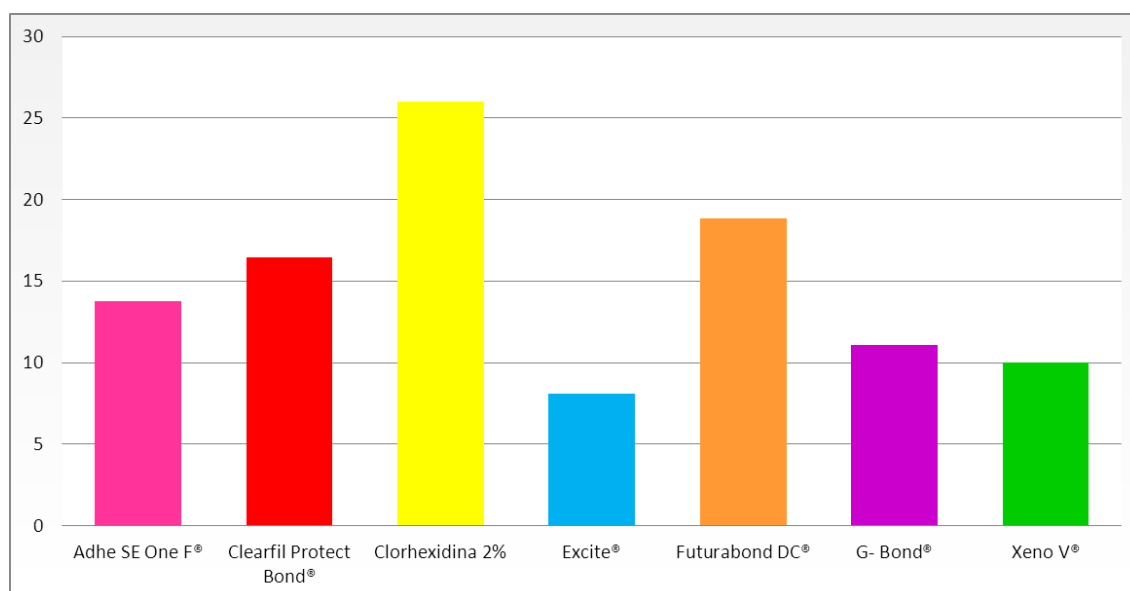


Gráfico 3: Test de Duncan tras ANOVA bifactorial para la variable PRODUCTO.

2.3 ANOVA Unifactorial y test de Duncan por cepa

Se realizaron doce tests de análisis de variancias (ANOVA) unifactoriales para cada una de las doce cepas microbianas enfrentadas a los siete productos de análisis. Los valores del estadístico p indican siempre la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,0001$) (Tabla 9). A continuación, se realizaron tests *a posteriori* de Duncan para hallar la localización de las diferencias estadísticas en el efecto inhibitorio de los productos.

Cepa	p
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<0,0001
<i>Bacillus subtilis</i>	<0,0001
<i>Cándida albicans</i>	<0,0001
<i>Enterococcus faecalis</i>	<0,0001
<i>Escherichia coli</i>	<0,0001
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<0,0001
<i>Lactobacillus casei</i>	<0,0001
<i>Micrococcus luteus</i>	<0,0001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<0,0001
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0,0001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<0,0001
<i>Streptococcus mutans</i>	<0,0001

Tabla 9: Valores de p tras ANOVA unifactorial para cada uno de los microorganismos.

2.3.1 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Actinomyces naeslundii*

Para la cepa *Actinomyces naeslundii*, la clorhexidina al 2% presenta la mayor capacidad inhibitoria, seguida de Futurabond DC® con diferencias entre si. Adhe SE One F® y Excite® generaron los halos de inhibición más pequeños significativamente (Tabla 10, Gráfico 4, Imagen 3). Para esta bacteria hay dos productos que comparten dos grupos Duncan, no hallándose diferencias con ninguno de ambos grupos. En el gráfico aparecen como una columna de dos colores los adhesivos autograbantes Clearfil Protect Bond® y Adhe SE One F®.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	50,38	4,4	A
Futurabond DC®	10	28,702	1,93	B
Xeno V®	10	14,035	2,73	C
G- Bond®	10	11,996	1,99	D
Clearfil Protect Bond®	10	11,665	0,96	D-E
Adhe SE One F®	10	9,764	0,86	E-F
Excite®	10	8,647	0,36	F

Tabla 10: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Actinomyces naeslundii*.

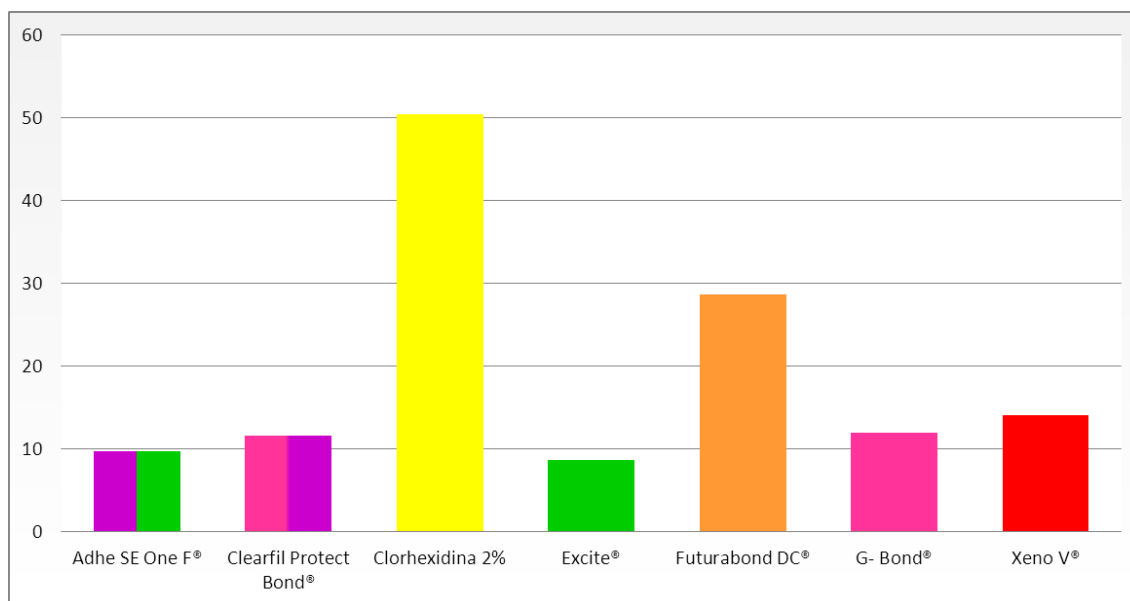


Gráfico 4: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Actinomyces naeslundii*.

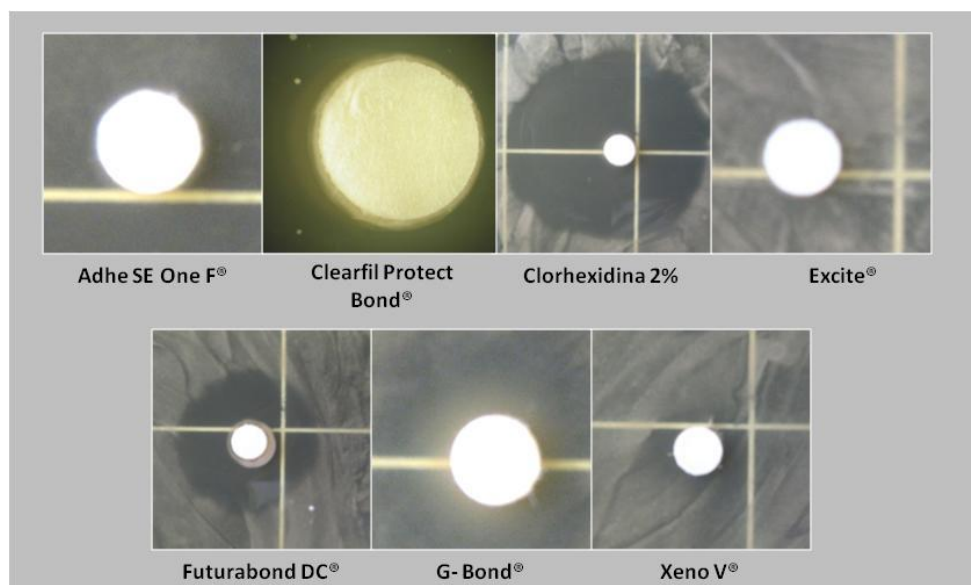


Imagen 3: Halos de inhibición del crecimiento de *Actinomyces naeslundii* generados por los siete productos evaluados.

2.3.2 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Bacillus subtilis*

Para la cepa *Bacillus subtilis*, Futurabond DC® y Adhe SE One F® (Grupo Duncan A) fueron, sin diferencias entre si, los inhibidores más potentes, seguidos de la clorhexidina al 2% (Grupo Duncan B) y de Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan C). Excite® (Grupo Duncan F) se comportó como el producto con menor capacidad inhibitoria (Tabla 11, Gráfico 5, Imagen 4).

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Futurabond DC®	10	25,7021	1,74	A
Adhe SE One F®	10	25,0874	0,92	A
Clorhexidina 2%	10	23,2724	1,14	B
Clearfil Protect Bond®	10	16,4932	2,21	C
G- Bond®	10	12,9384	2,49	D
Xeno V®	10	11,4006	1,19	E
Excite®	10	8,4313	0,87	F

Tabla 11: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Bacillus subtilis*.

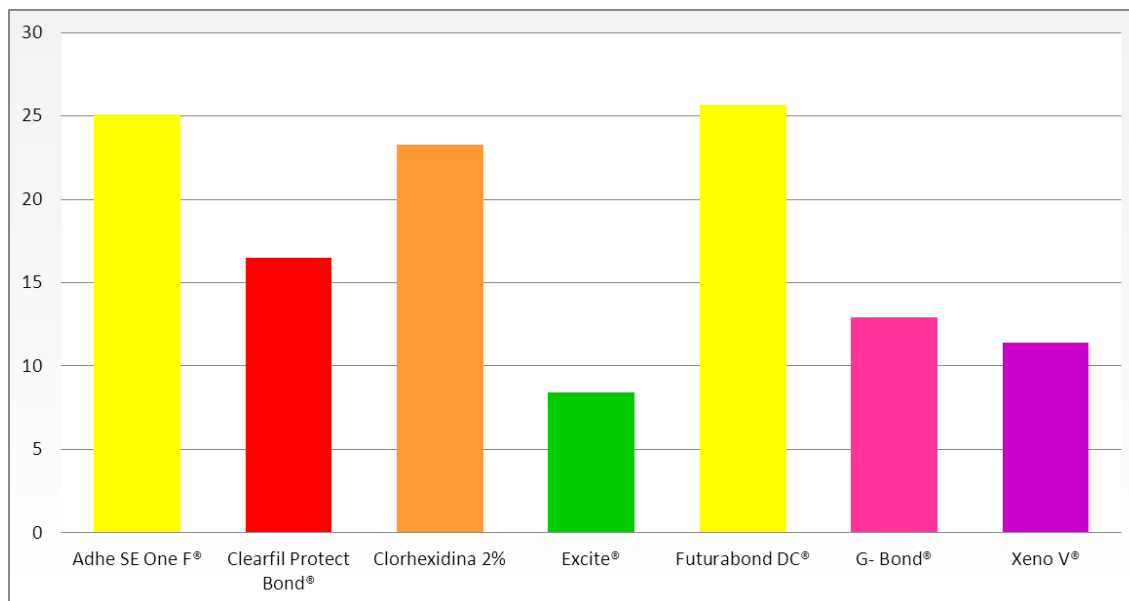


Gráfico 5: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Bacillus subtilis*.

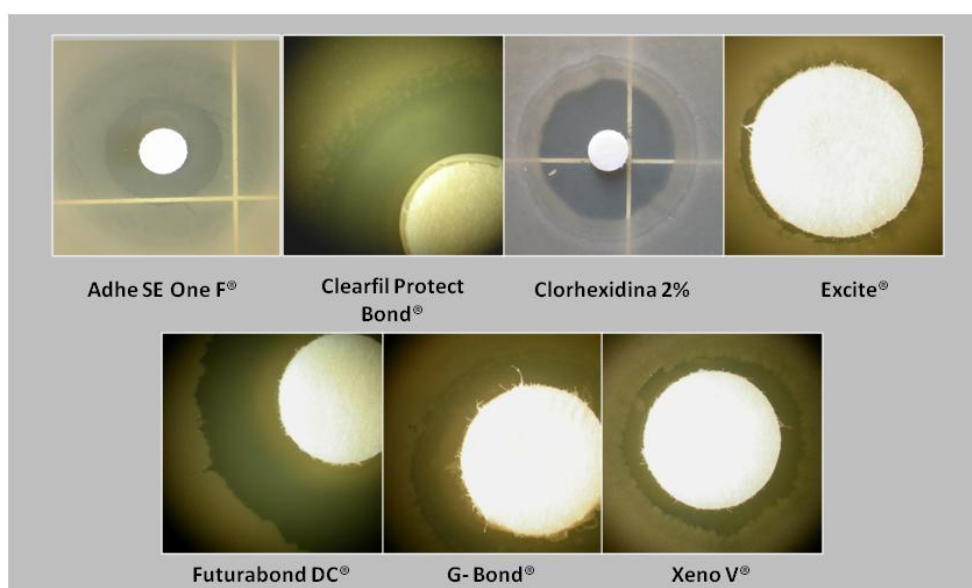


Imagen 4: Halos de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* generados por los siete productos evaluados.

2.3.3 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Candida albicans*

La clorhexidina al 2% y el adhesivo Futurabond DC® presentan halos de inhibición de mayor diámetro, mientras que G- Bond®, Adhe SE One F® y Excite® tienen los menores valores de inhibición (Tabla 12, Gráfico 5, Imagen 5).

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	22,6433	0,91	A
Futurabond DC®	10	14,9416	1,34	B
Clearfil Protect Bond®	10	8,795	0,57	C
Xeno V®	10	8,4909	0,39	C-D
Adhe SE One F®	10	8,2545	0,4	C-D
G- Bond®	10	7,8819	0,18	D-E
Excite®	10	7,5222	0,23	E

Tabla 12: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Candida albicans*.

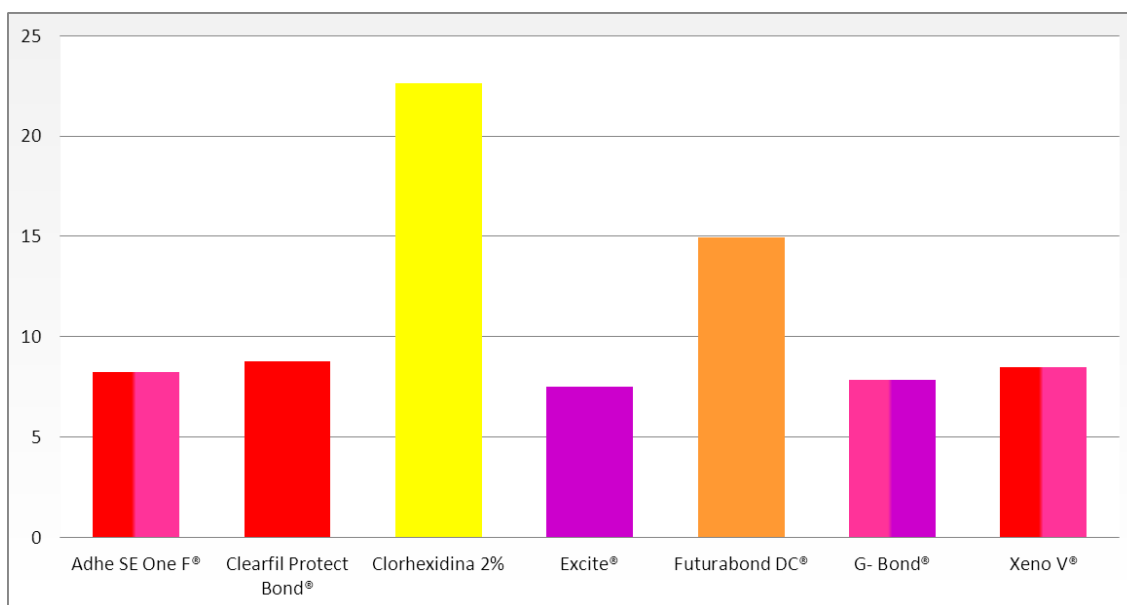


Gráfico 6: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Candida albicans*.



Imagen 5: Halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* generados por los siete productos evaluados.

2.3.4 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Enterococcus faecalis*

En el caso de *Enterococcus faecalis*, la clorhexidina al 2% y el adhesivo Futurabond DC® generan los halos de inhibición de mayor diámetro, mientras que G- Bond®, Adhe SE One F® y Excite® son los productos con menor capacidad inhibitoria (Tabla 13, Gráfico 7, Imagen 6).

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	19,5529	0,92	A
Futurabond DC®	10	16,5989	1,66	B
Clearfil Protect Bond®	10	12,5925	0,98	C
Xeno V®	10	9,286	0,69	D
G- Bond®	10	8,5216	0,72	D-E
Adhe SE One F®	10	7,9751	0,4	E-F
Excite®	10	7,2365	0,14	F

Tabla 13: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Enterococcus faecalis*.

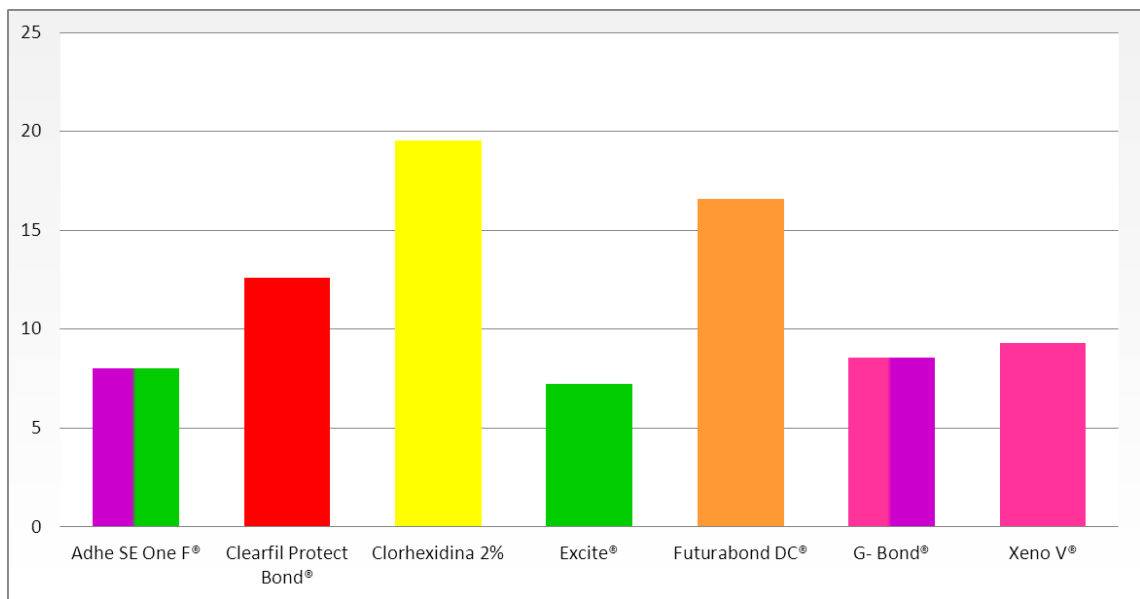


Gráfico 7: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Enterococcus faecalis*.

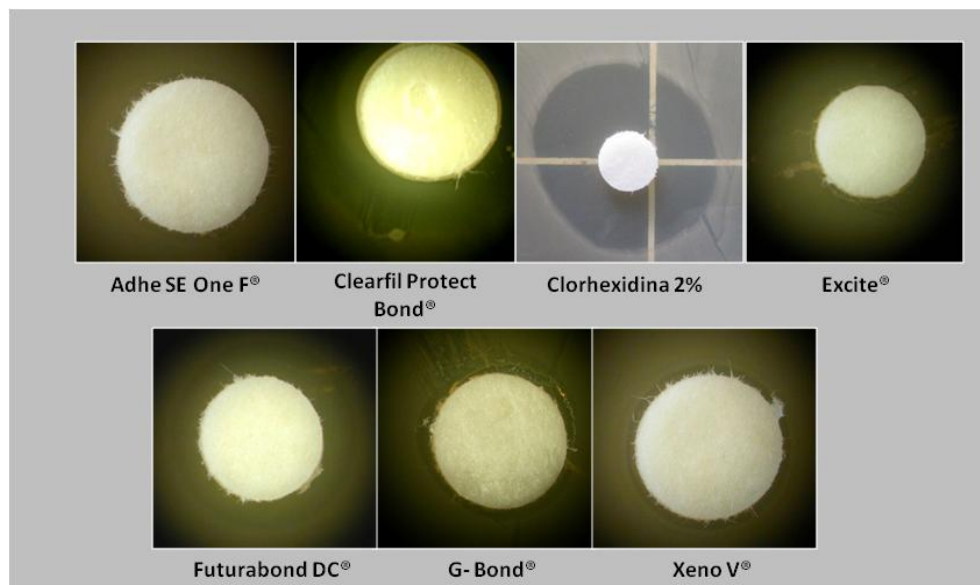


Imagen 6: Halos de inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis* generados por los siete productos evaluados.

2.3.5 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Escherichia coli*

En la cepa *Escherichia coli* (Tabla 14, Gráfico 8, Imagen 7), Excite®, Adhe SE One F® y Clearfil Protect Bond® presentan los menores valores de inhibición, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La clorhexidina al 2%, seguida de Futurabond DC® y Xeno V®, éstos últimos sin diferencias entre ellos, demostraron la mayor capacidad inhibitoria.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	14,678	0,85	A
Futurabond DC®	10	13,085	0,82	B
Xeno V®	10	12,887	1,4	B
G- Bond®	10	9,4372	1,03	C
Excite®	10	8,2618	0,46	D
Adhe SE One F®	10	7,8222	0,44	D
Clearfil Protect Bond®	10	7,8028	0,51	D

Tabla 14: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Escherichia coli*.

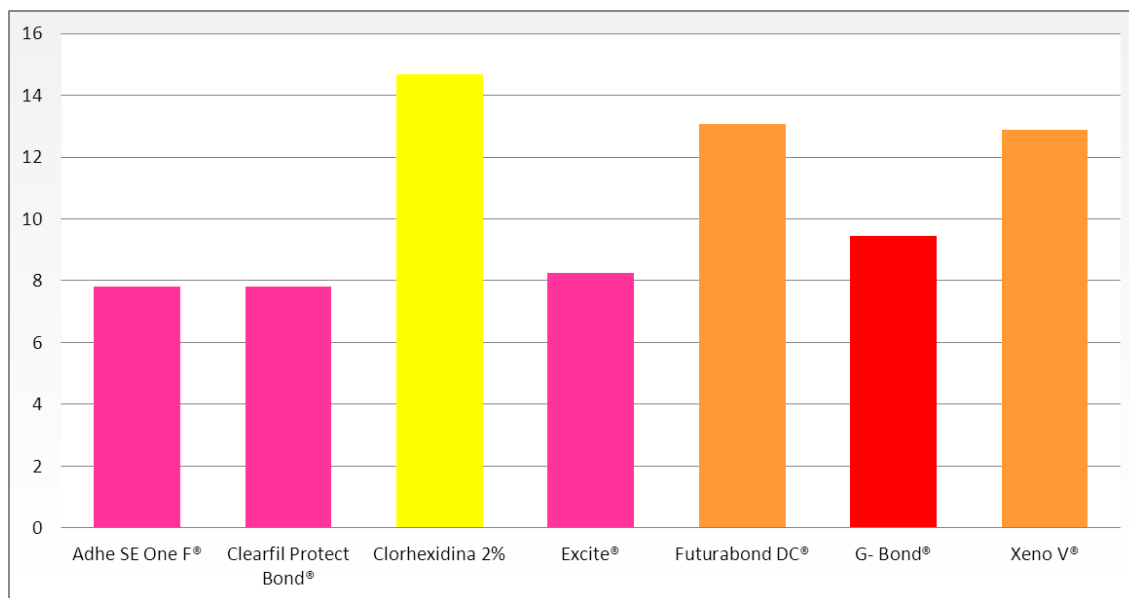


Gráfico 8: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Escherichia coli*.

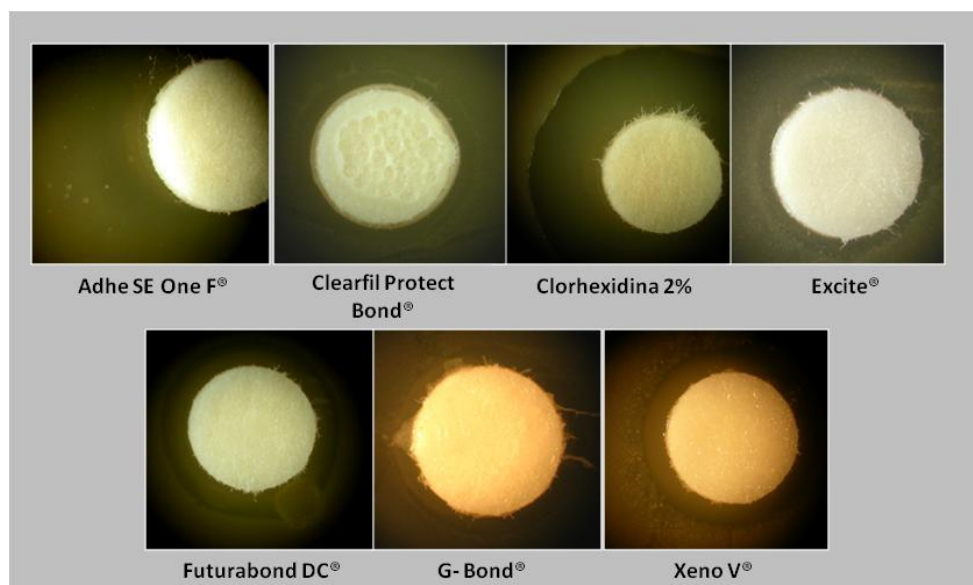


Imagen 7: Halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* generados por los siete productos evaluados.

2.3.6 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Lactobacillus acidophilus*

Para la cepa *Lactobacillus acidophilus* (Tabla 15, Gráfico 9, Imagen 8) la clorhexidina al 2% (Grupo Duncan A), Futurabond DC® (Grupo Duncan B) y Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan C) inhibieron significativamente más que G-Bond®, Adhe SE One F®, Excite® o Xeno V® (Grupo Duncan D).

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	22,4295	0,83	A
Futurabond DC®	10	15,4993	1,02	B
Clearfil Protect Bond®	10	12,2028	1,01	C
G-Bond®	10	7,9649	0,31	D
Adhe SE One F®	10	7,8269	0,45	D
Excite®	10	7,6748	0,34	D
Xeno V®	10	7,6131	0,36	D

Tabla 15: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

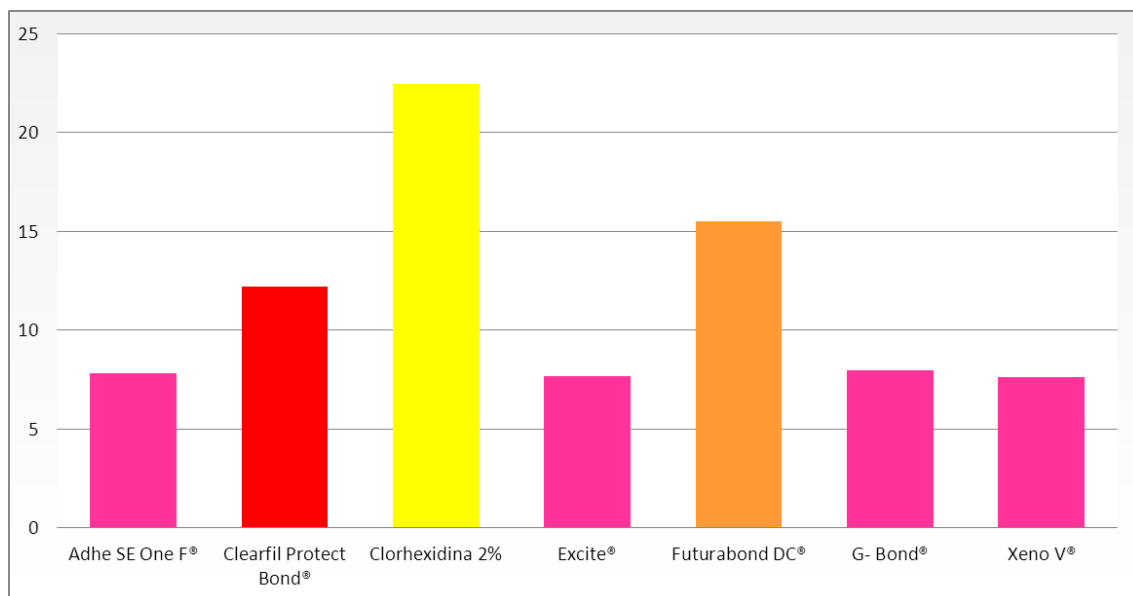


Gráfico 9: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

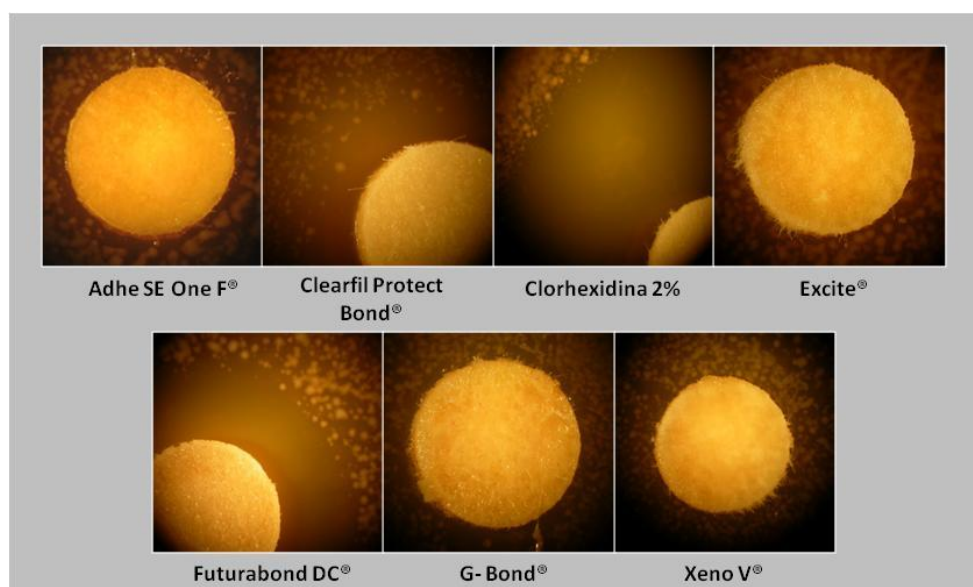


Imagen 8: Halos de inhibición del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* generados por los siete productos evaluados.

2.3.7 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Lactobacillus casei*

Para *Lactobacillus casei* (Tabla 16, Gráfico 10, Imagen 9), se alternan las posiciones de los tres primeros productos, siendo Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan A) el de mayor capacidad inhibitoria, seguido de clorhexidina al 2% (Grupo Duncan B) y Futurabond DC® (Grupo Duncan C). El resto de los adhesivos presentaron halos de menor diámetro, sin diferencias entre si.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clearfil Protect Bond®	10	31,3267	1,96	A
Clorhexidina 2%	10	26,4264	2,27	B
Futurabond DC®	10	19,9675	2,09	C
G- Bond®	10	8,5614	0,7	D
Xeno V®	10	7,6844	0,39	D
Excite®	10	7,6214	0,34	D
Adhe SE One F®	10	7,3786	0,21	D

Tabla 16: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Lactobacillus casei*.

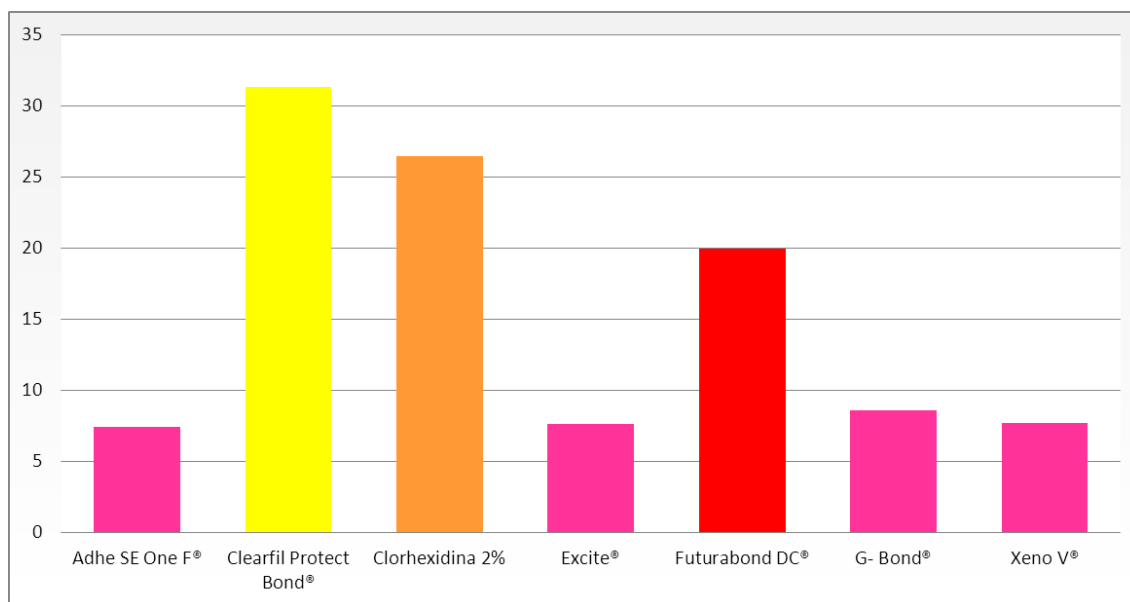


Gráfico 10: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Lactobacillus casei*.

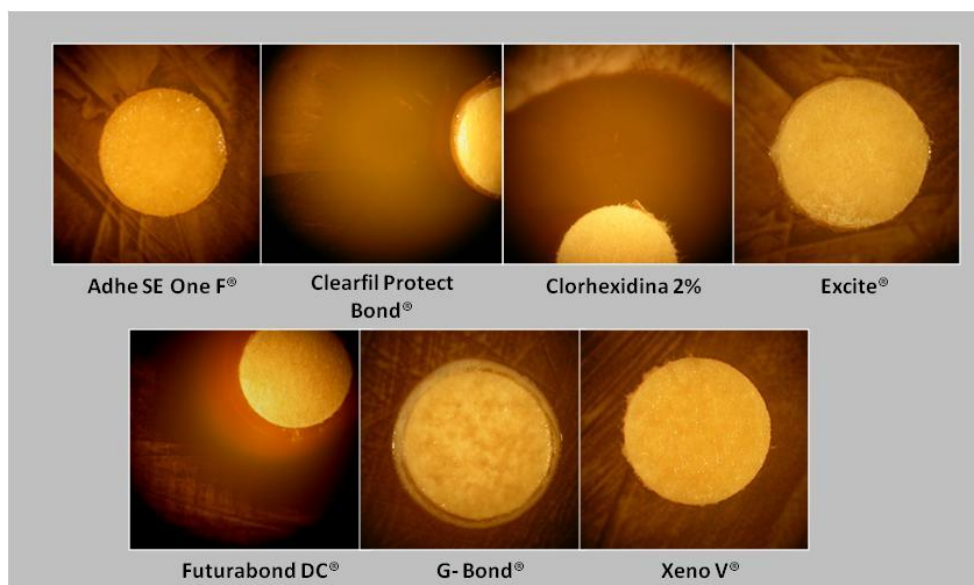


Imagen 9: Halos de inhibición del crecimiento de *Lactobacillus casei* generados por los siete productos evaluados.

2.3.8 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Micrococcus luteus*

Para la cepa *Micrococcus luteus* (Tabla 17, Gráfico 11, Imagen 10) los productos más inhibitorios fueron Adhe SE One F® (Grupo Duncan A), clorhexidina al 2% (Grupo Duncan B) y Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan C). Xeno V® y Excite® (Grupo Duncan E) presentaron la menor capacidad inhibitoria, sin diferencias entre si.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Adhe SE One F®	10	37,5339	1,23	A
Clorhexidina 2%	10	28,9856	1,99	B
Clearfil Protect Bond®	10	24,0976	1,29	C
Futurabond DC®	10	16,4788	1,22	D
G- Bond®	10	15,7295	0,72	D
Xeno V®	10	11,1677	0,8	E
Excite®	10	10,8638	2,03	E

Tabla 17: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Micrococcus luteus*.

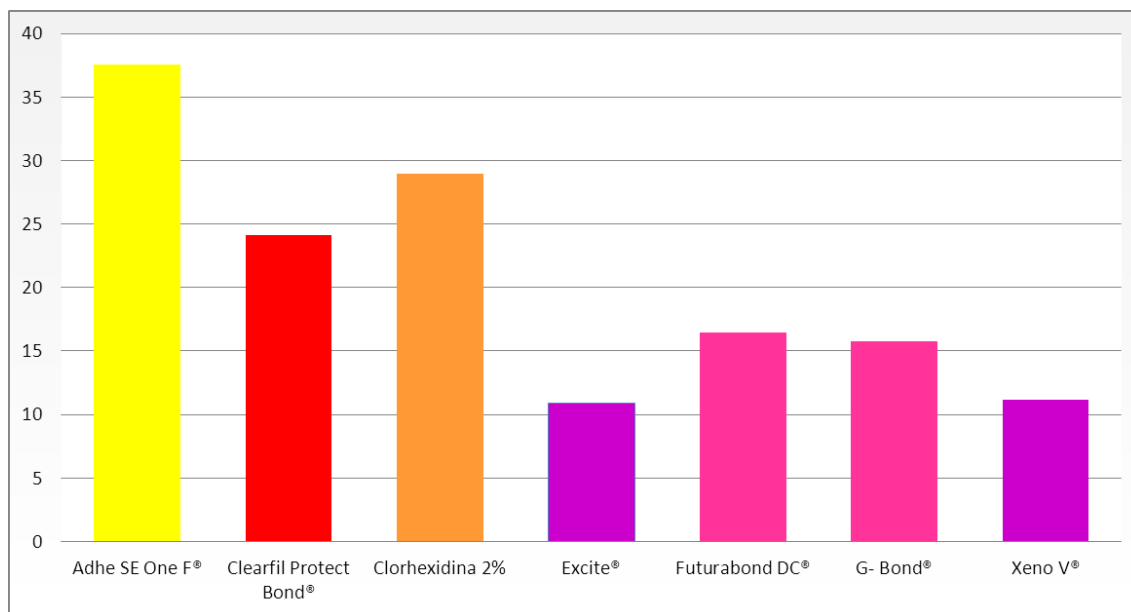


Gráfico 11: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Micrococcus luteus*.

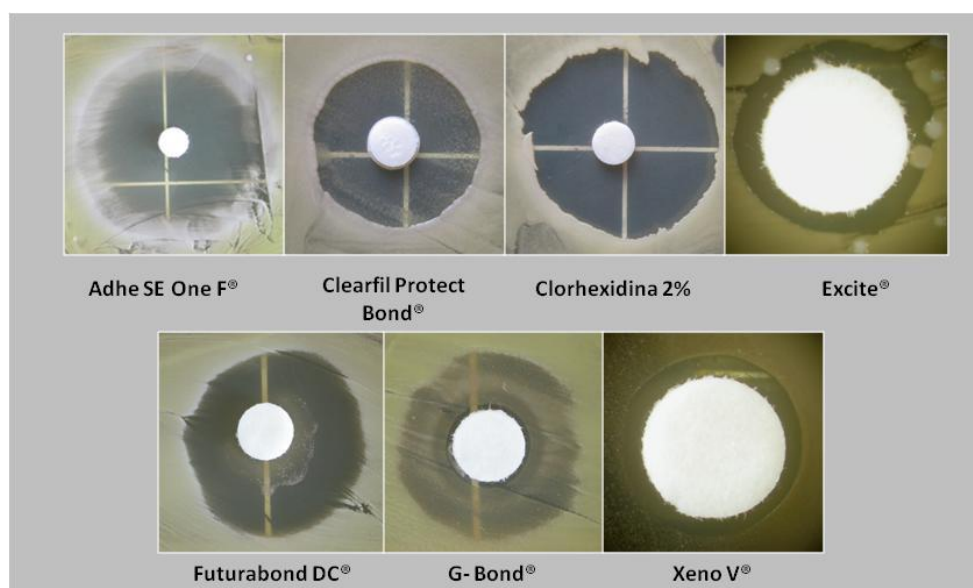


Imagen 10: Halos de inhibición del crecimiento de *Micrococcus luteus* generados por los siete productos evaluados.

2.3.9 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Pseudomonas aeruginosa*

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 18, Gráfico 12, Imagen 11) se ve fuertemente inhibida por la clorhexidina al 2% (Grupo Duncan A), seguida de Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan B). G- Bond®, Xeno V® y Excite®, sin diferencias entre si (Grupo Duncan D), se comportaron como los productos menos inhibitorios entre los analizados.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	26,0505	2,77	A
Clearfil Protect Bond®	10	21,7228	1,5	B
Adhe SE One F®	10	11,0063	1,31	C
Futurabond DC®	10	10,6125	1,12	C
G- Bond®	10	9,0001	0,64	D
Xeno V®	10	8,715	0,78	D
Excite®	10	7,8489	0,2	D

Tabla 18: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

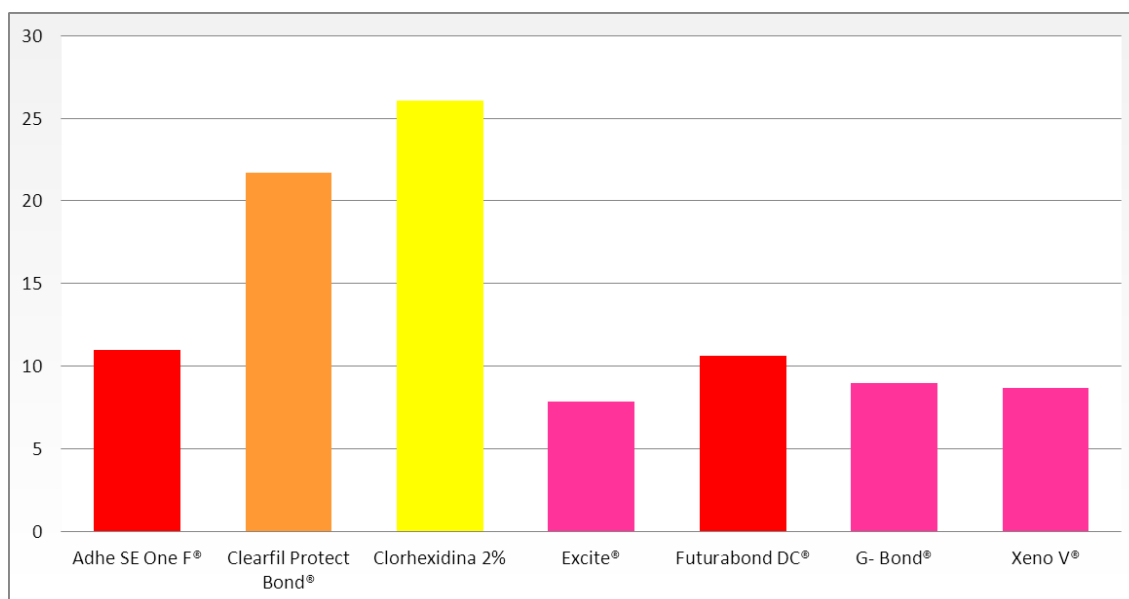


Gráfico 12: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

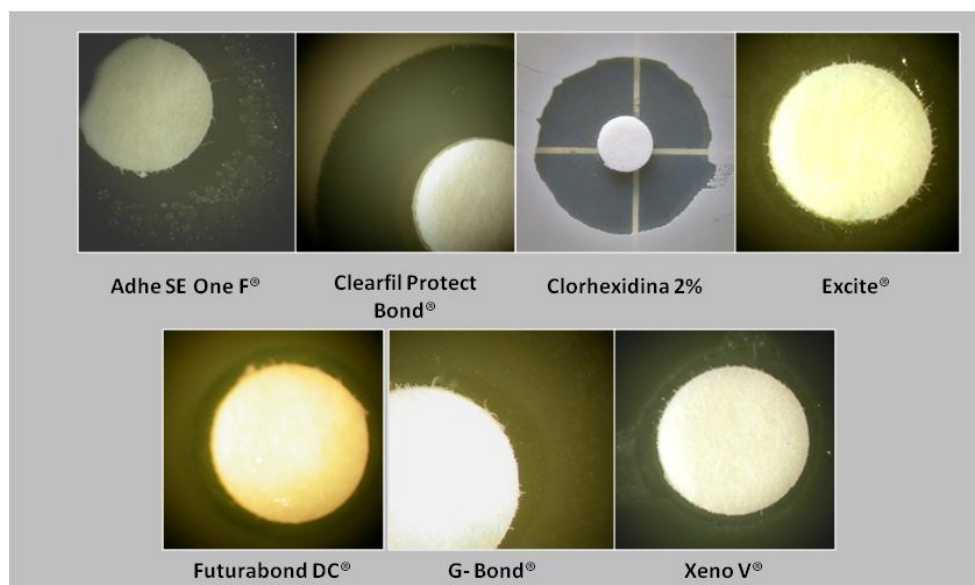


Imagen 11: Halos de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* generados por los siete productos evaluados.

2.3.10 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Staphylococcus aureus*

Para la especie *Staphylococcus aureus* (Tabla 19, Gráfico 13, Imagen 12), Adhe SE One F® y G- Bond® (Grupo Duncan A) fueron los agentes con mayor capacidad inhibitoria, mientras que el adhesivo de grabado total Excite® obtuvo los menores valores de inhibición de crecimiento bacteriano.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Adhe SE One F®	10	21,9039	0,94	A
G- Bond®	10	21,8653	1,51	A
Clearfil Protect Bond®	10	18,087	1,7	B
Futurabond DC®	10	17,6207	1,53	B
Clorhexidina 2%	10	14,4032	0,55	B
Xeno V®	10	9,3877	0,36	C
Excite®	10	7,9279	0,24	D

Tabla 19: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus*.

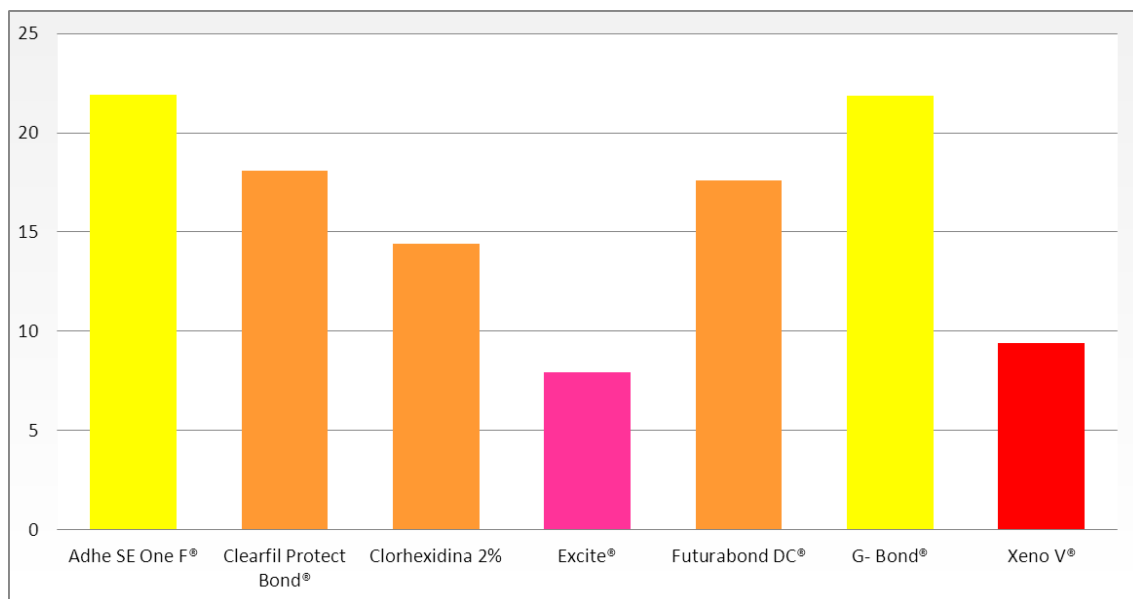


Gráfico 13: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Staphylococcus aureus*.

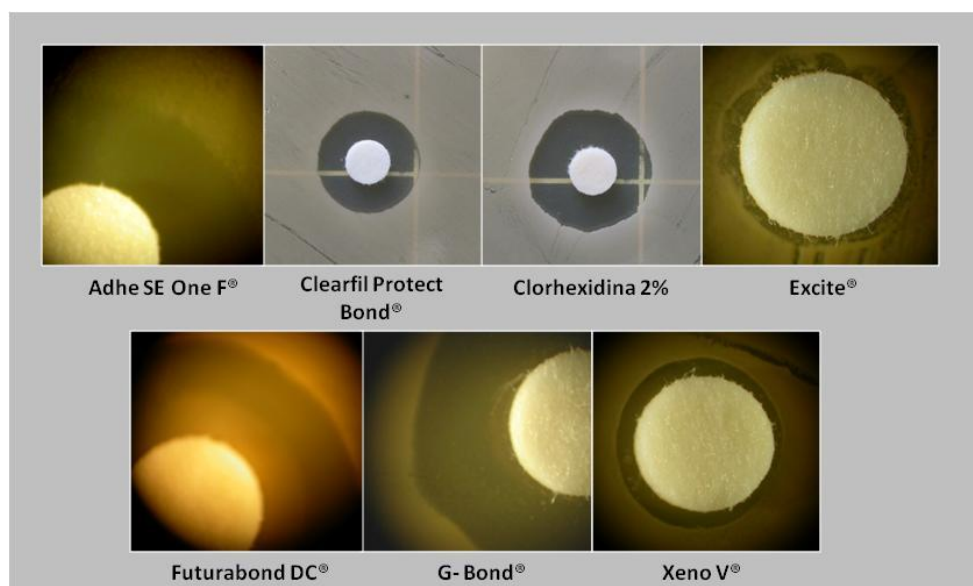


Imagen 12: Halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* generados por los siete productos evaluados.

2.3.11 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Staphylococcus epidermidis*

En el caso de *Staphylococcus epidermidis* (Tabla 20, Gráfico 14, Imagen 13), el adhesivo autograbante Futurabond DC® (Grupo Duncan A), seguido de la clorhexidina al 2% y Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan B) fueron los agentes más inhibitorios mientras que Excite® (Grupo Duncan E) se comportó nuevamente como el adhesivo con menor capacidad inhibitoria de los evaluados.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Futurabond DC®	10	27,5364	2,08	A
Clorhexidina 2%	10	19,8752	0,79	B
Clearfil Protect Bond®	10	19,9702	1,32	B
Adhe SE One F®	10	12,8304	2,79	C
G- Bond®	10	10,9481	2,13	D
Xeno V®	10	9,9861	0,74	D
Excite®	10	7,8635	0,35	E

Tabla 20: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Staphylococcus epidermidis*.

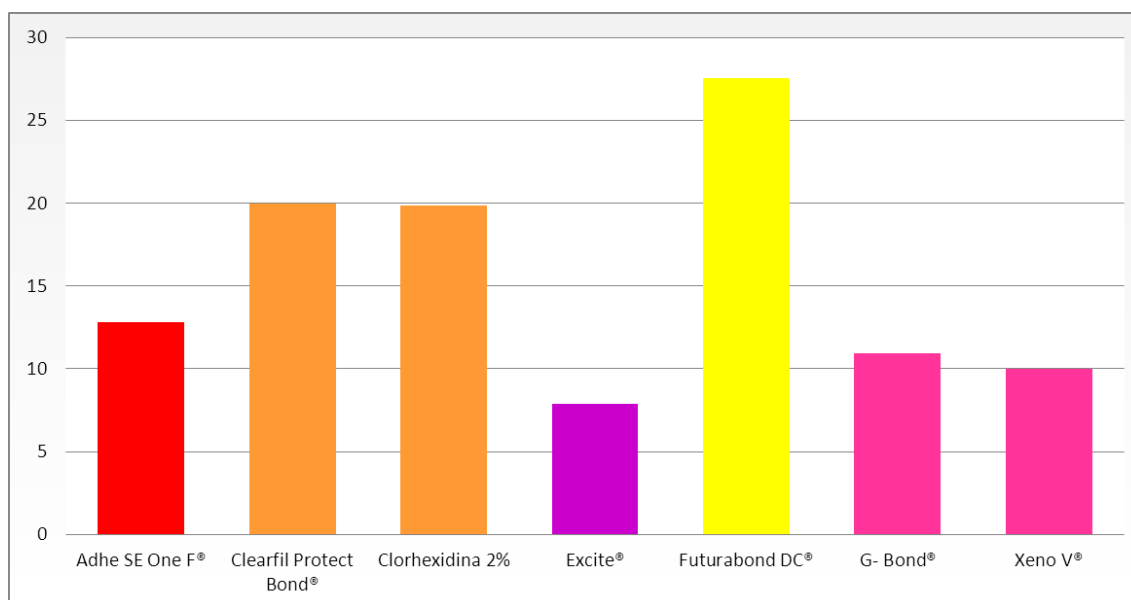


Gráfico 14: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Staphylococcus epidermidis*.

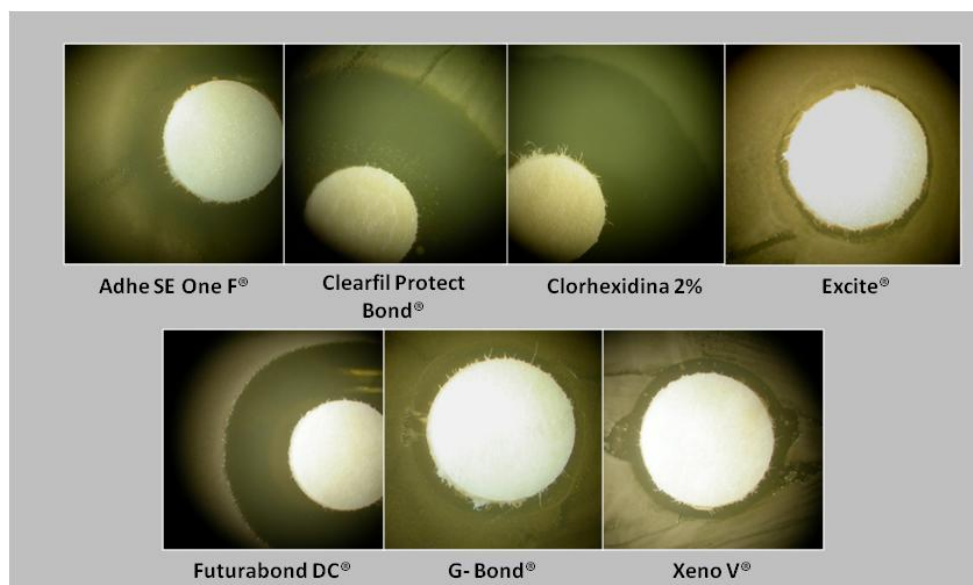


Imagen 13: Halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* generados por los siete productos evaluados.

2.3.12 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para *Streptococcus mutans*

La cepa *Streptococcus mutans* (Tabla 21, Gráfico 15, Imagen 14), fue inhibida en mayor medida por la clorhexidina al 2% (Grupo Duncan A) y el adhesivo Futurabond DC® (Grupo Duncan B). Clearfil Protect Bond®, Xeno V®, G- Bond®, Adhe SE One F® y Excite® (Grupo Duncan E) demostraron la menor capacidad inhibitoria para esta cepa.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	10	40,6609	0,61	A
Futurabond DC®	10	19,2971	1,49	B
Clearfil Protect Bond®	10	13,8888	3,04	C
Xeno V®	10	9,3972	0,66	D
G- Bond®	10	8,0643	0,31	E
Adhe SE One F®	10	7,9784	0,59	E
Excite®	10	7,2537	0,09	E

Tabla 21: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la cepa *Streptococcus mutans*.

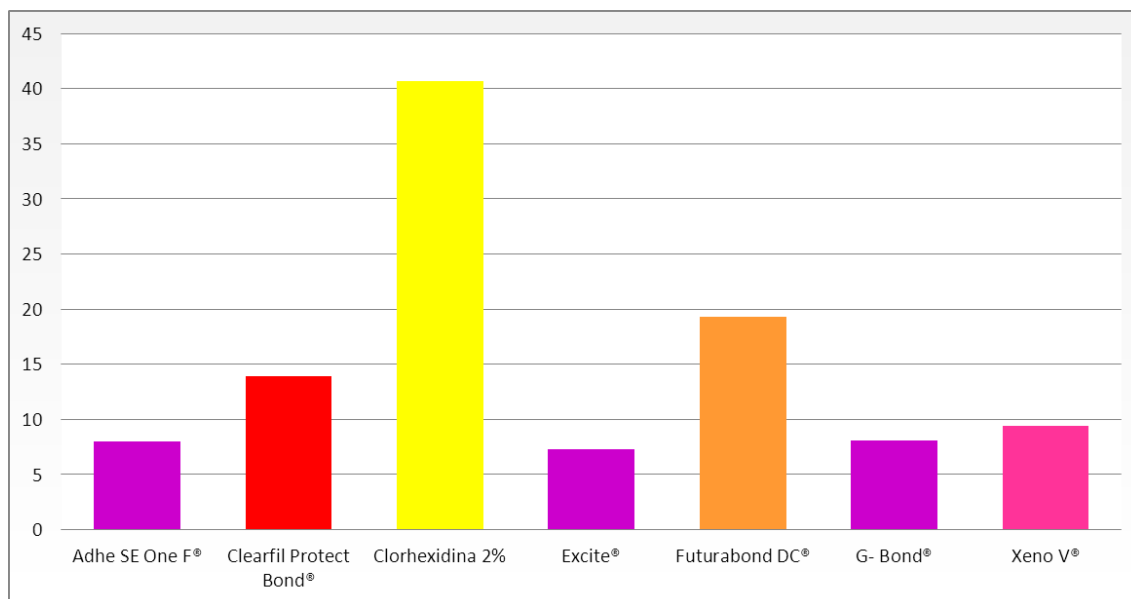


Gráfico 15: Test de Duncan tras ANOVA unifactorial para la cepa *Streptococcus mutans*.

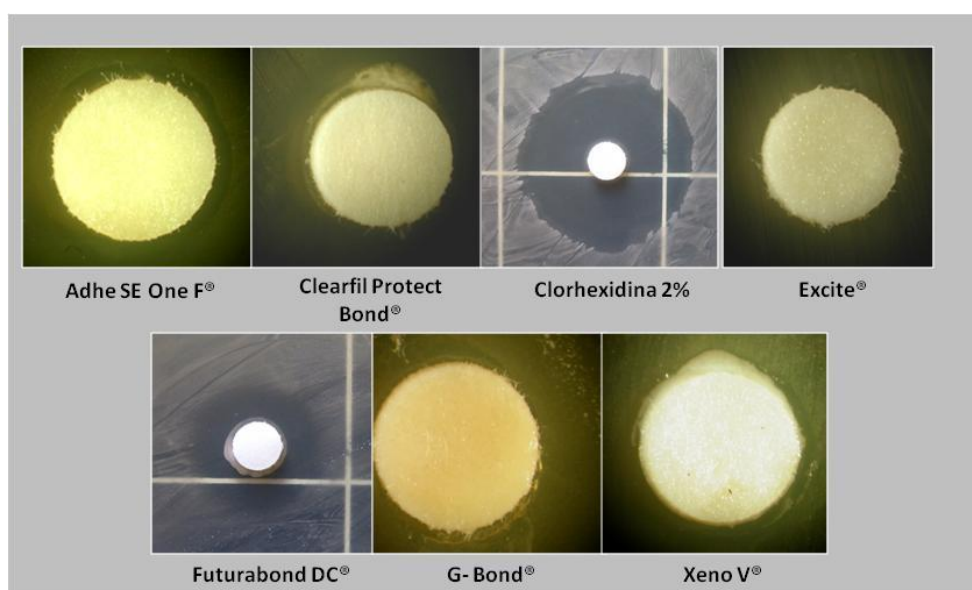


Imagen 14: Halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* generados por los siete productos evaluados.

2.4 ANOVA Unifactorial y test de Duncan por producto

Se realizaron del mismo modo siete tests de análisis de variancias (ANOVA) unifactoriales para cada uno de los siete productos evaluados enfrentados a las doce cepas microbianas empleadas. Los valores del estadístico p de cada uno de ellos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas para todos ellos ($p < 0,0001$) (Tabla 22). A continuación se realizaron tests *a posteriori* de Duncan para hallar la localización de las diferencias estadísticas en el grado de sensibilidad de los microorganismos a la acción de cada uno de los adhesivos.

Producto	p
Adhe SE One F®	<0,0001
Clorhexidina 2%	<0,0001
Clearfil Protect Bond®	<0,0001
Excite®	<0,0001
Futurabond DC®	<0,0001
G- Bond®	<0,0001
Xeno V®	<0,0001

Tabla 22: Valores de p tras ANOVA unifactorial para cada uno de los adhesivos.

2.4.1 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Adhe SE One F®

Para el adhesivo autograbante modificado con fluoruros, Adhe SE One F® (Tabla 23, Gráfico 16), *Micrococcus luteus* (Grupo Duncan A) y *Bacillus subtilis* (Grupo Duncan B) fueron los microorganismos más sensibles. En el grupo de menos sensibles se incluyen, sin diferencias entre si (Grupo Duncan G), las dos especies de *Lactobacillus*, la levadura *Candida albicans*, el principal causante de caries *Streptococcus mutans*, además de *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Micrococcus luteus</i>	10	37,5339	1,23	A
<i>Bacillus subtilis</i>	10	25,0874	0,92	B
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	21,9039	0,94	C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	12,8302	2,79	D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	11,0063	1,31	E
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	9,7643	0,86	F
<i>Candida albicans</i>	10	8,2545	0,40	G
<i>Streptococcus mutans</i>	10	7,9784	0,59	G
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	7,9751	0,40	G
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	7,8269	0,45	G
<i>Escherichia coli</i>	10	7,8222	0,44	G
<i>Lactobacillus casei</i>	10	7,3787	0,21	G

Tabla 23: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Adhe SE One F®.

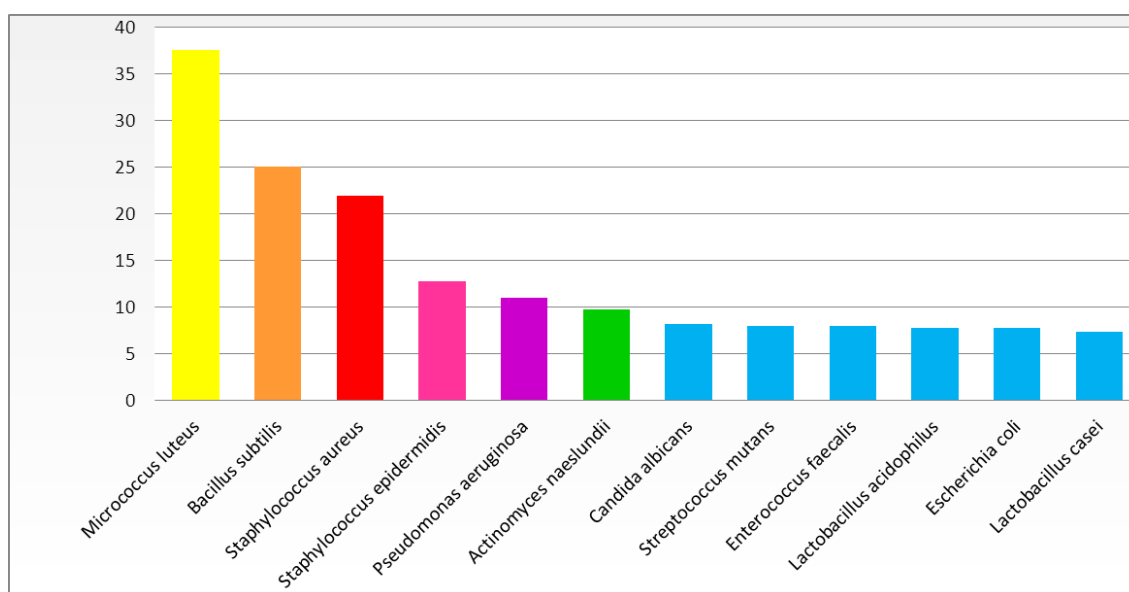


Gráfico 16: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Adhe SE One F®.

2.4.2 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para el digluconato de clorhexidina al 2%

En lo referente al producto control, el digluconato de clorhexidina al 2% (Tabla 24, Gráfico 17), *Micrococcus luteus* (Grupo Duncan A) fue nuevamente la especie más sensible, seguida del principal microorganismo cariogénico, *Streptococcus mutans* (Grupo Duncan B). Las bacterias más resistentes a la acción de la clorhexidina al 2% bajo las condiciones de estudio fueron *Staphylococcus aureus* (Grupo Duncan G) y *Escherichia coli* (Grupo Duncan H).

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	50,3798	4,40	A
<i>Streptococcus mutans</i>	10	40,6609	0,61	B
<i>Micrococcus luteus</i>	10	28,9856	1,99	C
<i>Lactobacillus casei</i>	10	26,4264	2,27	D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	26,0505	2,77	D
<i>Bacillus subtilis</i>	10	23,2724	1,14	E
<i>Candida albicans</i>	10	22,6433	0,91	E
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	22,4295	0,83	E
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	19,8753	0,79	F
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	19,5529	0,92	F
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	17,4032	0,55	G
<i>Escherichia coli</i>	10	14,678	0,85	H

Tabla 24: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el control positivo, digluconato de clorhexidina al 2%.

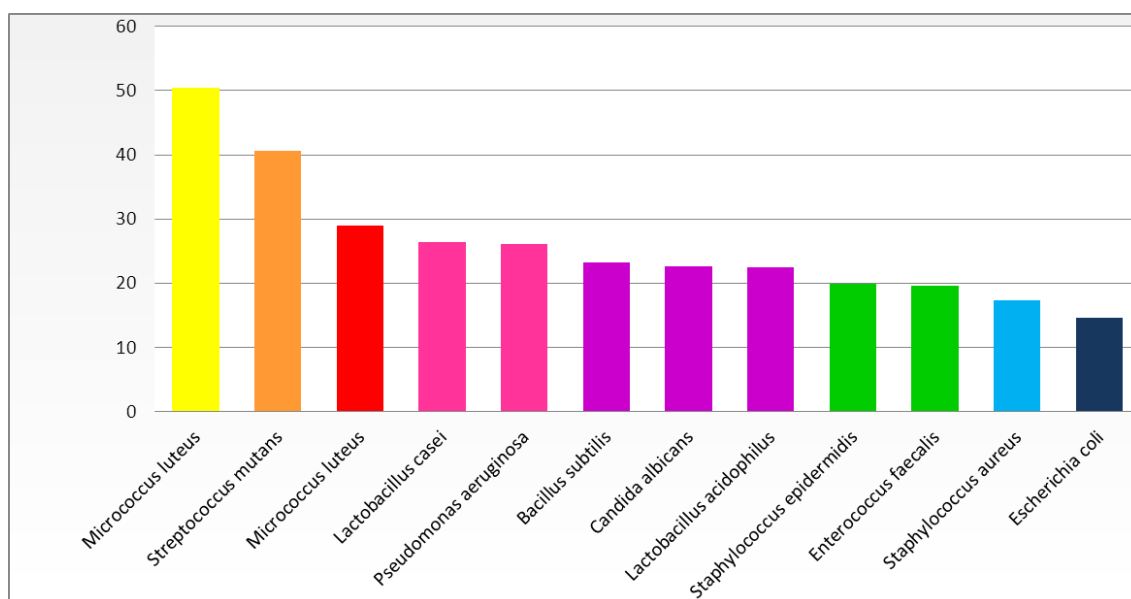


Gráfico 17: Test de Duncan para el digluconato de clorhexidina al 2%.

2.4.3 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Clearfil Protect Bond®

Para el adhesivo autograbante antibacteriano Clearfil Protect Bond® (Tabla 25, Gráfico 18), *Lactobacillus casei* (Grupo Duncan A) y *Micrococcus luteus* (Grupo Duncan B) fueron los más sensibles. Por el contrario, otros microorganismos cariogénicos están entre los poco sensibles a su acción como *Streptococcus mutans* (Grupo Duncan F), *Lactobacillus acidophilus* o *Actinomyces naeslundii* (Grupo Duncan G).

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Lactobacillus casei</i>	10	37,5339	1,96	A
<i>Micrococcus luteus</i>	10	24,0976	1,29	B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	21,7228	1,50	C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	18,9703	1,32	D
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	18,087	1,70	D
<i>Bacillus subtilis</i>	10	16,4932	2,21	E
<i>Streptococcus mutans</i>	10	13,8888	3,04	F
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	12,5925	0,98	F-G
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	12,2028	1,01	G
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	11,6653	0,96	G
<i>Candida albicans</i>	10	8,795	0,57	H
<i>Escherichia coli</i>	10	7,8028	0,51	H

Tabla 25: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante antibacteriano Clearfil Protect Bond®.

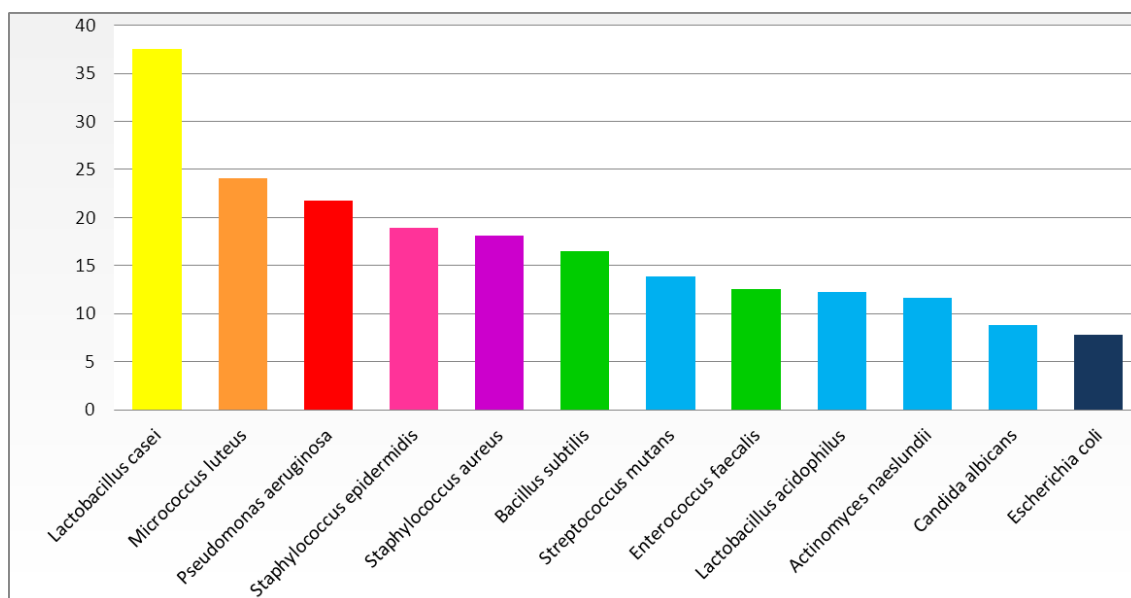


Gráfico 18: Test de Duncan para el adhesivo autograbante antibacteriano Clearfil Protect Bond®.

2.4.4 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Excite®

Los valores de inhibición presentaron escasas diferencias entre los microorganismos para el adhesivo de grabado total Excite® (Tabla 26, Gráfico 19), indicando en todos ellos una leve capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Se encontraron diferencias entre *Micrococcus luteus* (Grupo Duncan A) que fue nuevamente el más sensible y el resto de bacterias, con valores próximos entre si.

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Micrococcus luteus</i>	10	10,8638	2,03	A
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	8,6474	0,36	B
<i>Bacillus subtilis</i>	10	8,4313	0,87	B-C
<i>Escherichia coli</i>	10	8,2618	0,46	B-C-D
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7,9279	0,24	C-D-E
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	7,8635	0,35	C-D-E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	7,849	0,20	C-D-E
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	7,6748	0,34	D-E
<i>Lactobacillus casei</i>	10	7,6214	0,34	D-E
<i>Candida albicans</i>	10	7,5222	0,23	E
<i>Streptococcus mutans</i>	10	7,2537	0,09	E
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	7,2365	0,14	E

Tabla 26: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo de grabado total Excite®.

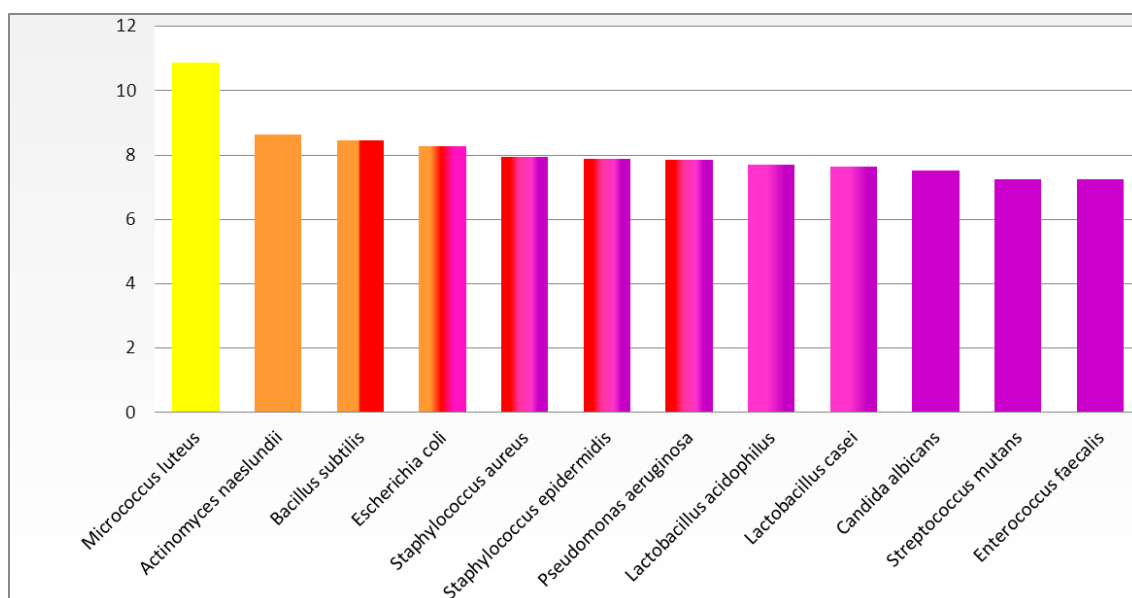


Gráfico 19: Test de Duncan para el adhesivo Excite®.

2.4.5 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Futurabond DC®

En el caso de Futurabond DC® (Tabla 27, Gráfico 20) *Actinomyces naeslundii* y *Staphylococcus epidermidis* (Grupo Duncan A), presentaron un mayor valor de inhibición de su crecimiento que el resto. *Pseudomonas aeruginosa* (Grupo Duncan H) fue el microorganismo más resistente a la acción de este adhesivo.

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	28,7019	1,93	A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	27,5364	2,08	A
<i>Bacillus subtilis</i>	10	25,7021	1,74	B
<i>Lactobacillus casei</i>	10	19,9675	2,09	C
<i>Streptococcus mutans</i>	10	19,2971	1,49	C
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	17,6207	1,53	D
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	16,5989	1,66	D-E
<i>Micrococcus luteus</i>	10	16,4789	1,22	D-E
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	15,4993	1,02	E-F
<i>Candida albicans</i>	10	14,9416	1,34	F
<i>Escherichia coli</i>	10	13,0851	0,82	G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10,6125	1,12	H

Tabla 27: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Futurabond DC®.

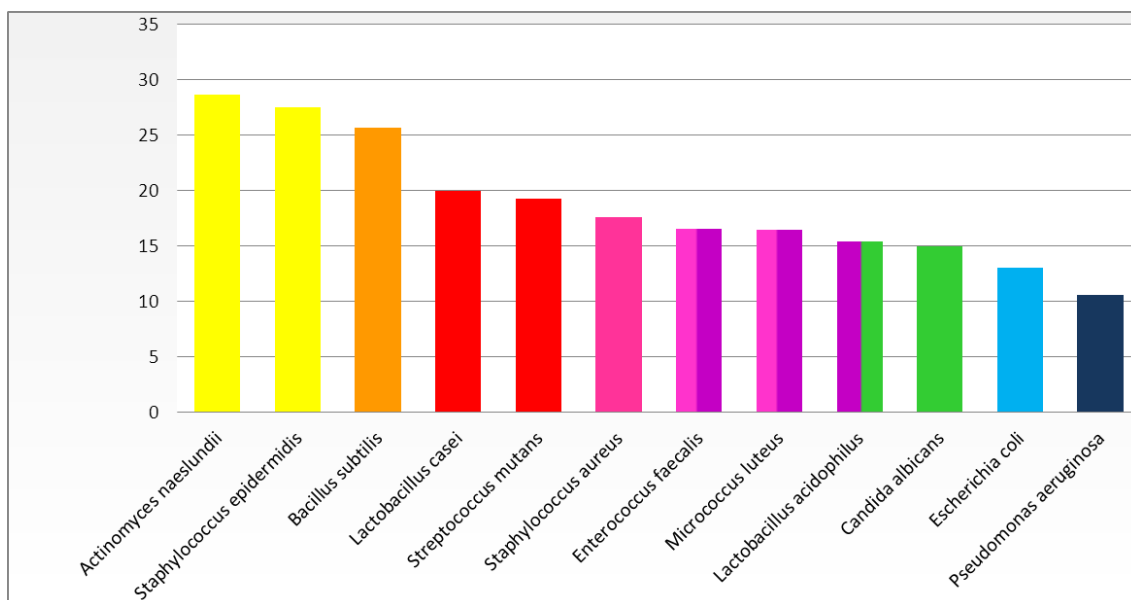


Gráfico 20: Test de Duncan para el adhesivo autograbante dual Futurabond DC®.

2.4.6 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para G- Bond®

Respecto al adhesivo autograbante G- Bond® (Tabla 28, Gráfico 21), *Staphylococcus aureus* (Grupo Duncan A) y *Micrococcus luteus* (Grupo Duncan B) presentaron los mayores niveles de inhibición; por el contrario, hay un amplio grupo formado por *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* (Grupo Duncan F) que se mostraron muy resistentes a su efecto sin diferencias entre sí.

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	21,8653	1,51	A
<i>Micrococcus luteus</i>	10	15,7295	0,72	B
<i>Bacillus subtilis</i>	10	12,9384	2,49	C
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	11,9956	1,99	C-D
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	10,9481	2,13	D
<i>Escherichia coli</i>	10	9,4371	1,03	E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	9	0,64	E-F
<i>Lactobacillus casei</i>	10	8,5614	0,70	E-F
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	8,5216	0,72	E-F
<i>Streptococcus mutans</i>	10	8,0644	0,31	F
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	7,9649	0,31	F
<i>Candida albicans</i>	10	7,8819	0,18	F

Tabla 28: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante G- Bond.

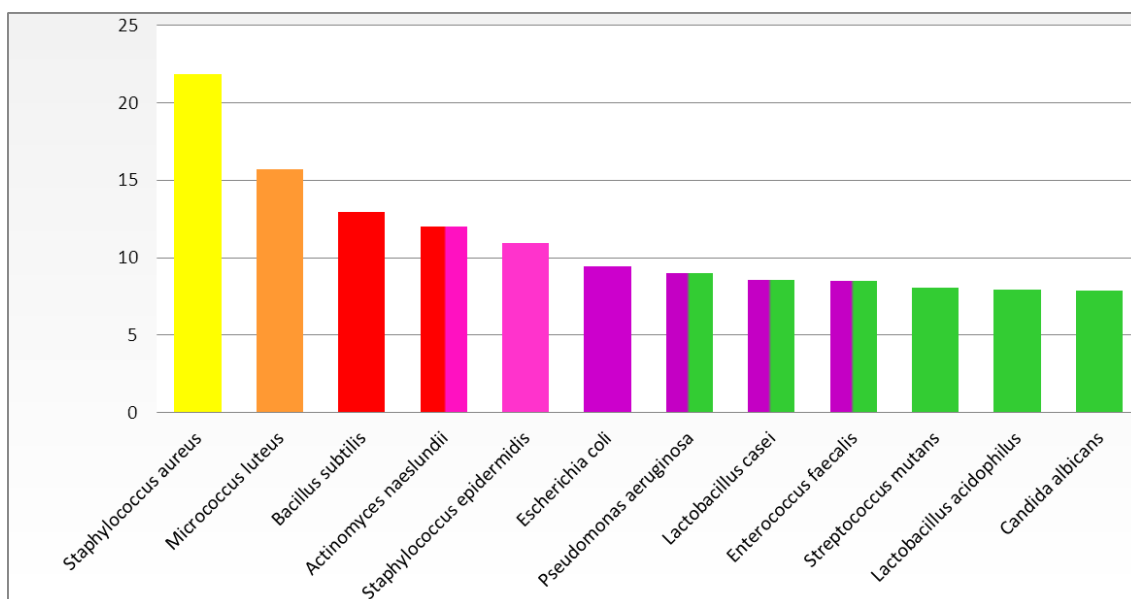


Gráfico 21: Test de Duncan para el adhesivo autograbante G-Bond®.

2.4.7. ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Xeno V®

Las dos especies de *Lactobacillus* y la levadura *Candida albicans* (Grupo Duncan F) fueron los microorganismos más resistentes a la acción del adhesivo autograbante Xeno V® (Tabla 29, Gráfico 22), mientras que *Actinomyces naeslundii* (Grupo Duncan A) y *Escherichia coli* (Grupo Duncan B) presentaron los halos de inhibición de mayor diámetro de los evaluados tras la aplicación de dicho adhesivo.

Cepa	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10	14,0352	2,73	A
<i>Escherichia coli</i>	10	12,887	1,40	B
<i>Bacillus subtilis</i>	10	11,4006	1,19	C
<i>Micrococcus luteus</i>	10	11,1677	0,80	C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	9,986	0,74	D
<i>Streptococcus mutans</i>	10	9,3972	0,66	D-E
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	9,3877	0,36	D-E
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	9,286	0,69	D-E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	8,715	0,78	E
<i>Candida albicans</i>	10	8,4909	0,39	E-F
<i>Lactobacillus casei</i>	10	7,6844	0,39	F
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	7,6131	0,36	F

Tabla 29: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Xeno V®.

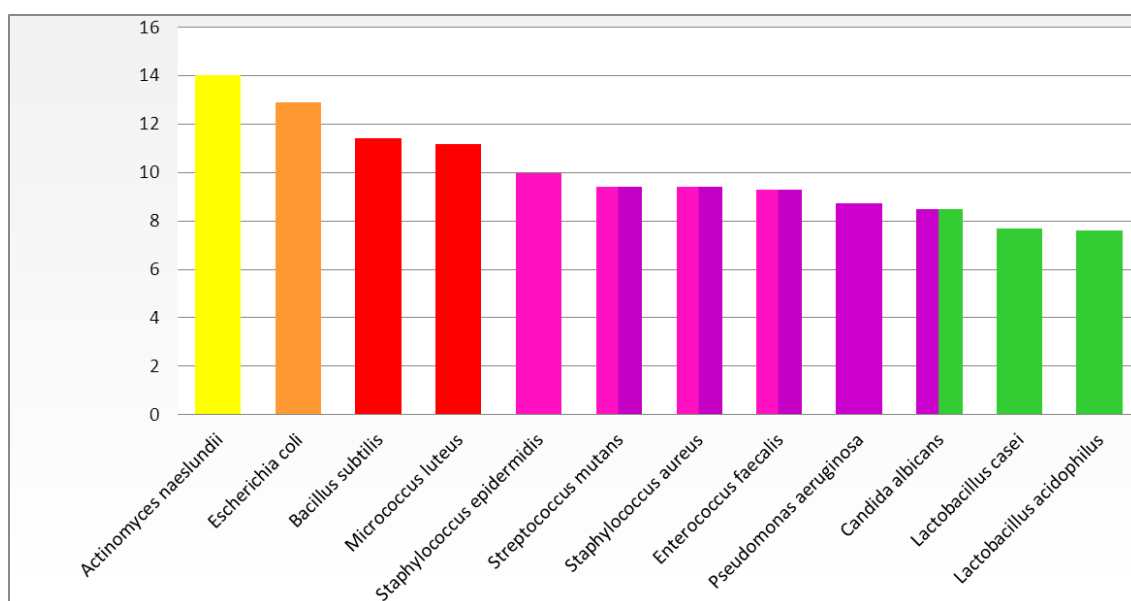


Gráfico 22: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Xeno V®.

3. GRÁFICO DE INTERACCIÓN GRUPO DE BACTERIAS- PRODUCTO PARA LOS GRUPOS CRIES- NO CRIES

En el siguiente gráfico de interacción (Gráfico 23) aparecen representados los resultados de todos los productos frente a los dos grupos de microorganismos (CRIES/ NO CRIES). Al igual que en el gráfico de interacción de las bacterias sin agrupar, se observa que las líneas correspondientes a cada uno de los productos se entrecruzan y no muestran paralelismo entre si, indicando la presencia de interacción entre las dos variables, PRODUCTO y GRUPO DE BACTERIAS.

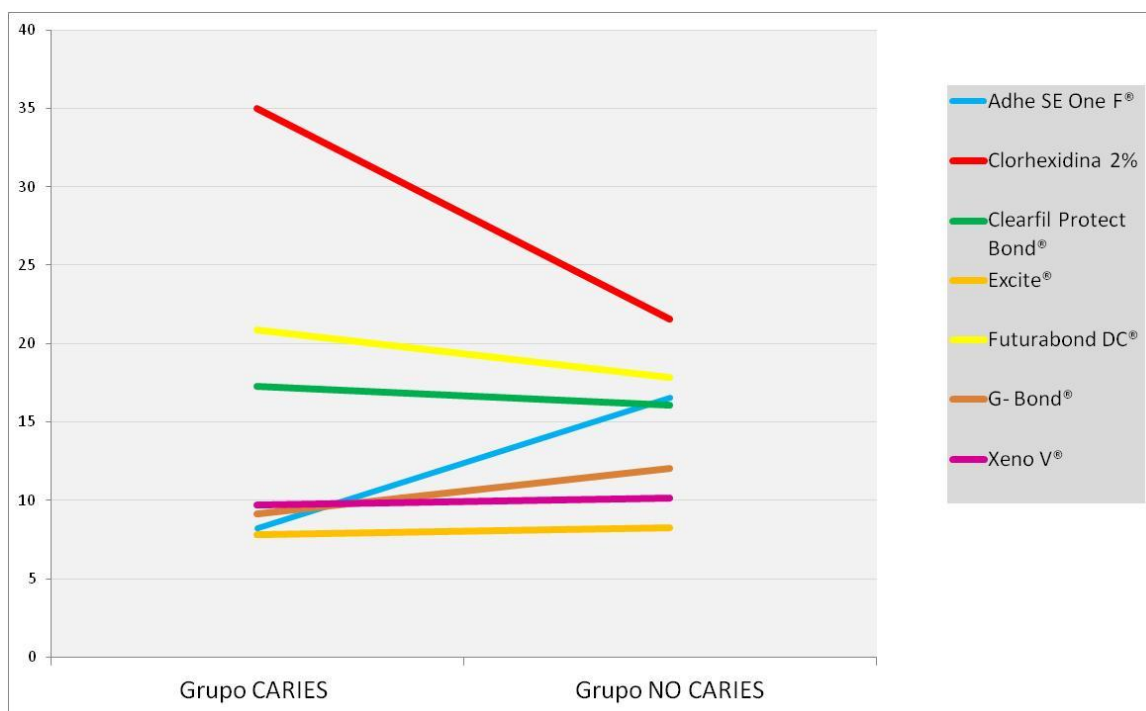


Gráfico 23: Gráfico de interacción entre los dos grupos de microorganismos y el efecto inhibitorio de los siete productos evaluados.

4. ESTADÍSTICA ANALÍTICA PARA LOS GRUPOS CRIES- NO CRIES

4.1 ANOVA Bifactorial para los grupos CRIES- NO CRIES

Con el objetivo de mantener una elevada potencia estadística tras el agrupamiento de los microorganismos, se realizó un test de ANOVA bifactorial. Siendo el diámetro del halo de inhibición la variable dependiente, ANOVA encontró un valor de $p= 0,058$ para la variable CEPA como independiente, indicando la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (Tabla 30). A continuación se realizó un test *a posteriori* de Duncan para confirmar la ausencia de diferencias (Tabla 31, Gráfico 24). Los valores de ANOVA bifactorial para la variable PRODUCTO son los mismos que sin agrupar los microorganismos en base a su efecto sobre la caries (Tabla 8).

Variable independiente	<i>p</i>
Grupo de bacterias	0,058
Producto	< 0,0001
Grupo de bacterias por producto	< 0,0001

Tabla 30: Valores de *p* tras ANOVA bifactorial para las variables GRUPO DE BACTERIAS, PRODUCTO y GRUPO DE BACTERIAS*PRODUCTO.

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo Caries	280	15,4253	10,96	A
Grupo No Caries	560	14,6359	7,02	A

Tabla 31: ANOVA bifactorial y test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para la variable GRUPO DE BACTERIAS.

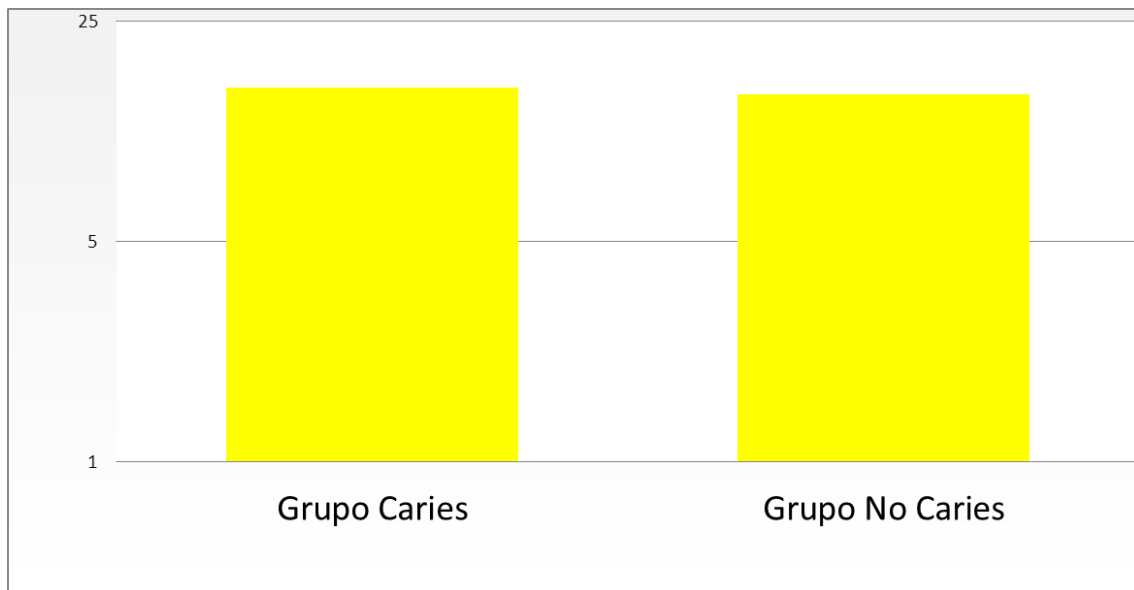


Gráfico 24: Test de Duncan tras ANOVA bifactorial para la variable GRUPO DE BACTERIAS.

4.2 ANOVA Unifactorial para los grupos CRIES- NO CRIES frente a los productos

Se realizaron dos tests de análisis de variancias (ANOVA) unifactoriales para cada uno de los dos grupos de cepas microbianas, enfrentados a los siete productos de análisis. Ambos tests indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los productos enfrentados tanto al grupo CRIES como al grupo NO CRIES ($p < 0,0001$) (Tabla 32).

Grupo de bacterias	p
No caries	< 0,0001
Caries	< 0,0001

Tabla 32: Valores de p tras ANOVA unifactorial para la variable GRUPO DE BACTERIAS.

4.2.1 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para el grupo NO CARIES

Para el grupo NO CARIES (Tabla 33, Gráfico 25), la clorhexidina al 2% fue el producto más eficaz (Grupo Duncan A), seguido de Futurabond DC®, Adhe SE One F® y Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan B). Excite® (Grupo Duncan E) se comporta como el adhesivo menos eficaz en la inhibición de crecimiento de estos ocho microorganismos.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	80	21,5577	4,58	A
Futurabond DC®	80	17,822	5,72	B
Adhe SE One F®	80	16,5517	10,17	B
Clearfil Protect Bond®	80	16,0701	5,69	B
G- Bond®	80	12,0402	42,66	C
Xeno V®	80	10,1651	1,65	D
Excite®	80	8,2445	1,32	E

Tabla 33: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el grupo NO CARIES.

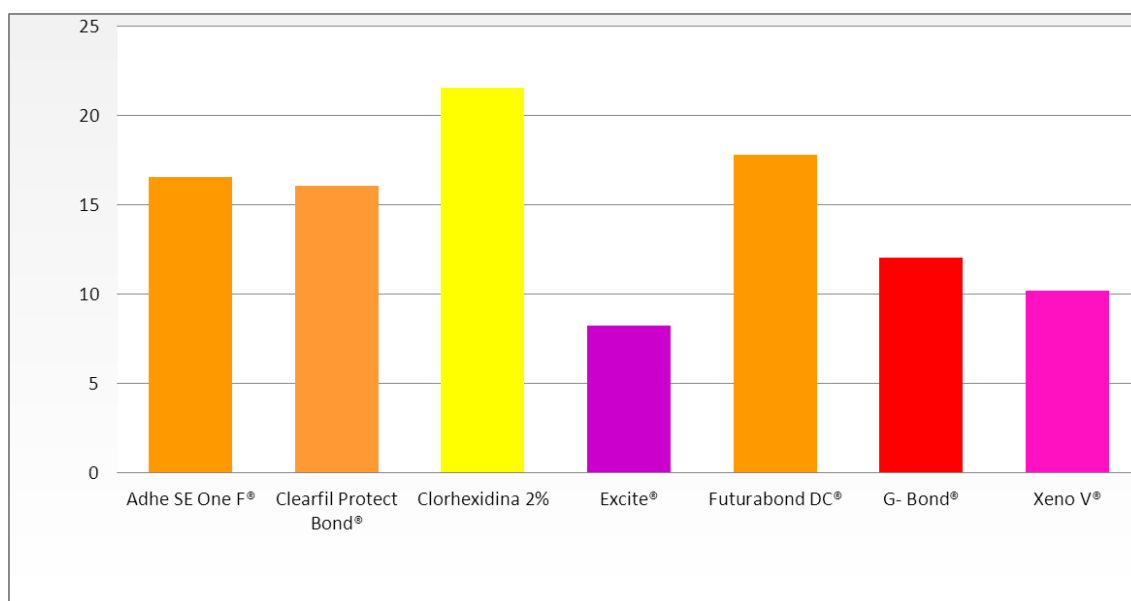


Gráfico 25: Test de Duncan para el grupo NO CARIES.

4.2.2 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para el grupo CARIES

Para el grupo CARIES (Tabla 34, Gráfico 26), de nuevo el digluconato de clorhexidina al 2% se comporta como el más potente inhibidor del crecimiento bacteriano (Grupo Duncan A), seguido por Futurabond DC® (Grupo Duncan B) y el adhesivo antibacteriano Clearfil Protect Bond® (Grupo Duncan C). Xeno V®, G-Bond®, Adhe SE One F® y Excite® (Grupo Duncan D) resultaron ser los cuatro productos menos efectivos para inhibir el crecimiento de los cuatro microorganismos cariogénicos sin diferencias entre si.

Producto	n	Media (mm)	Desviación estándar (mm)	Agrupamiento Duncan
Clorhexidina 2%	40	34,974	11,58	A
Futurabond DC®	40	20,866	5,16	B
Clearfil Protect Bond®	40	17,271	8,47	C
Xeno V®	40	9,682	2,98	D
G- Bond®	40	9,147	1,97	D
Adhe SE One F®	40	8,237	1,07	D
Excite®	40	7,799	0,6	D

Tabla 34: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el grupo CARIES.

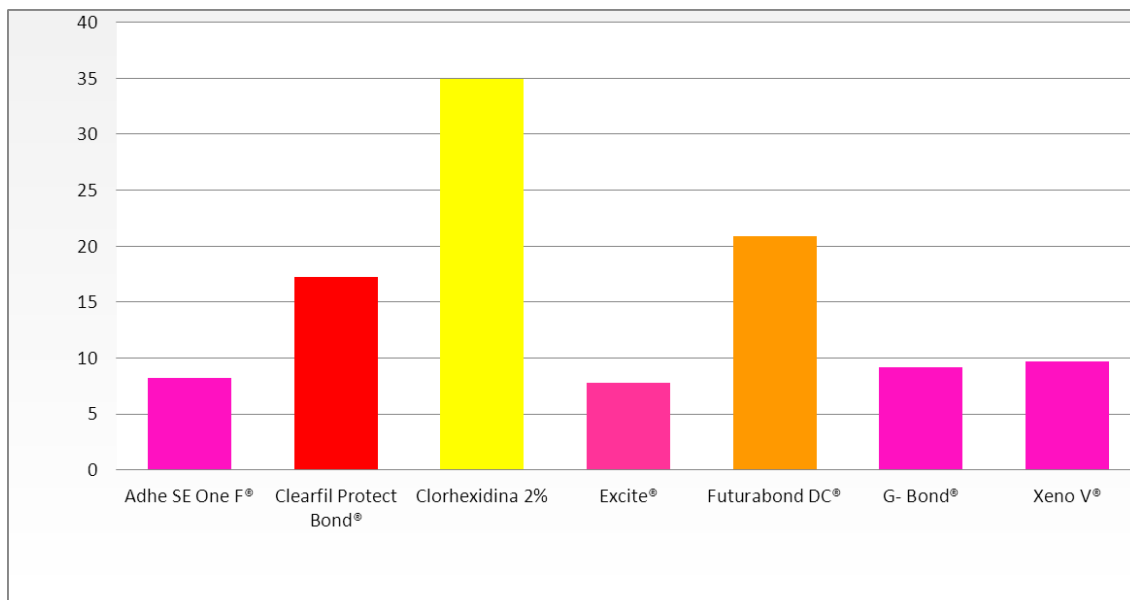


Gráfico 26: Test de Duncan para el grupo CARIES.

4.3 ANOVA Unifactorial para los productos frente a los grupos CARIES- NO CARIES

Se realizaron del mismo modo siete tests de análisis de variancias (ANOVA) unifactoriales para cada uno de los siete productos evaluados enfrentados a los dos grupos bacterianos. Los valores del estadístico p (Tabla 35) encuentran la existencia de diferencias entre los dos grupos para los productos Adhe SE One F[®], Futurabond DC[®], G- Bond[®], Excite[®] y el control positivo.

Producto	p
Adhe SE One F [®]	<0,0001
Clorhexidina 2%	<0,0001
Clearfil Protect Bond [®]	0,3592
Excite [®]	0,0442
Futurabond DC [®]	0,0053
G- Bond [®]	0,0003
Xeno V [®]	0,2559

Tabla 35: Valores de p tras ANOVA unifactorial para cada uno de los productos evaluados frente a los dos grupos de microorganismos.

A continuación se realizaron tests *a posteriori* de Duncan para hallar la localización de las diferencias estadísticas en el grado de sensibilidad a la acción de los adhesivos de los microorganismos, agrupados en base a su acción patogénica.

4.3.1 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Adhe SE One F® frente a los grupos CRIES- NO CRIES

El valor de p tras ANOVA unifactorial para el adhesivo modificado con fluoruros, Adhe SE One F®, revela la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). El test *post-hoc* de Duncan evidencia un efecto mucho mayor sobre el grupo NO CRIES que sobre los microorganismos cariogénicos (Tabla 36, Gráfico 27).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo No Caries	80	16,552	A
Grupo Caries	40	8,237	B

Tabla 36: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Adhe SE One F®.

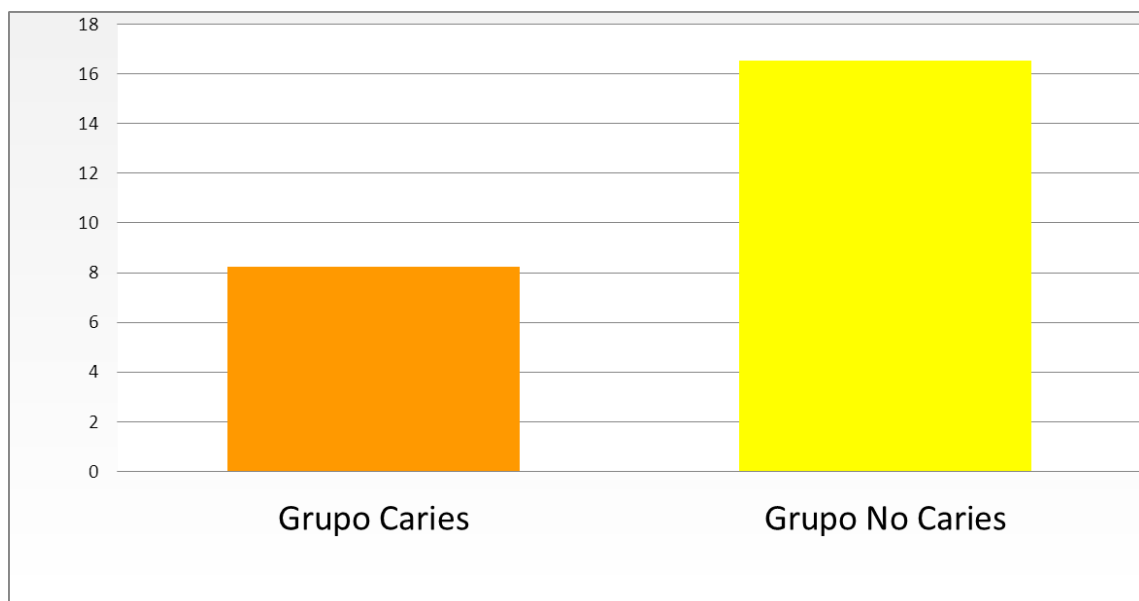


Gráfico 27: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Adhe SE One F®.

4.3.2 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para el digluconato de clorhexidina al 2% frente a los grupos CRIES- NO CRIES.

El test de ANOVA para el control, digluconato de clorhexidina 2%, ($p < 0,0001$), indica la existencia de diferencias entre los grupos bacterianos. Los microorganismos cariogénicos son mucho más sensibles a su efecto inhibitorio que el grupo NO CRIES (Tabla 37, Gráfico 28).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo Caries	40	34,974	A
Grupo No Caries	80	21,558	B

Tabla 37: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el control positivo, digluconato de clorhexidina al 2%.

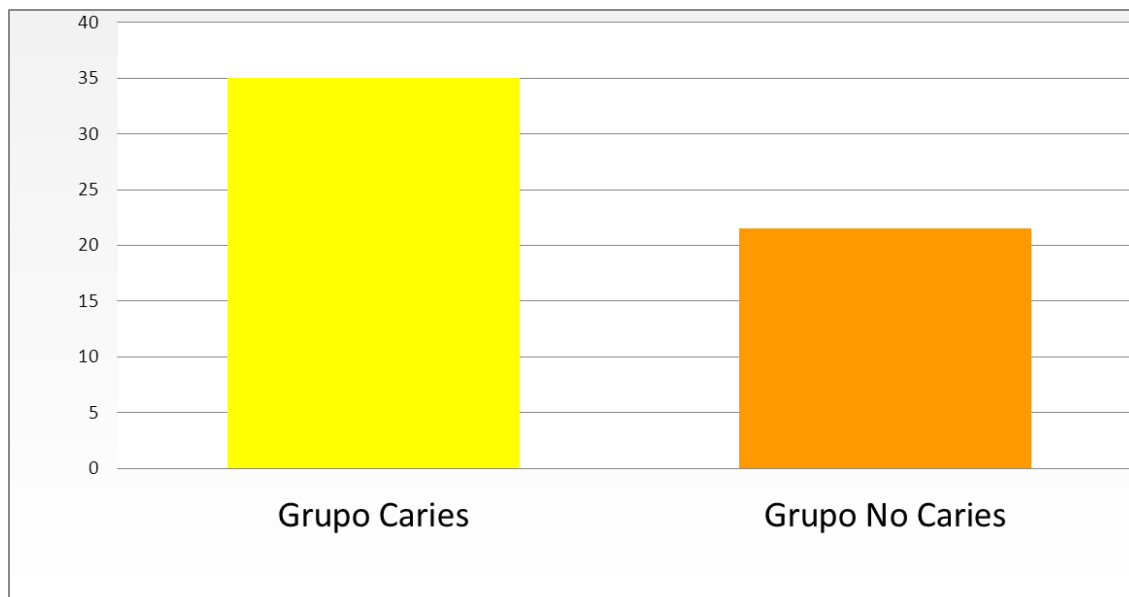


Gráfico 28: Test de Duncan para el control positivo, digluconato de clorhexidina al 2%.

4.3.3 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Clearfil Protect Bond® frente a los grupos CRIES- NO CRIES.

El valor de p del adhesivo específicamente diseñado para inhibir el crecimiento de microorganismos asociados con la caries dental, Clearfil Protect Bond®, revela la ausencia de diferencias entre los grupos ($p=0,3592$), aunque la actividad antibacteriana es ligeramente mayor en el caso de las bacterias cariogénicas (Tabla 38, Gráfico 29).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo Caries	40	17,271	A
Grupo No Caries	80	16,07	A

Tabla 38: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante antibacteriano Clearfil Protect Bond®.

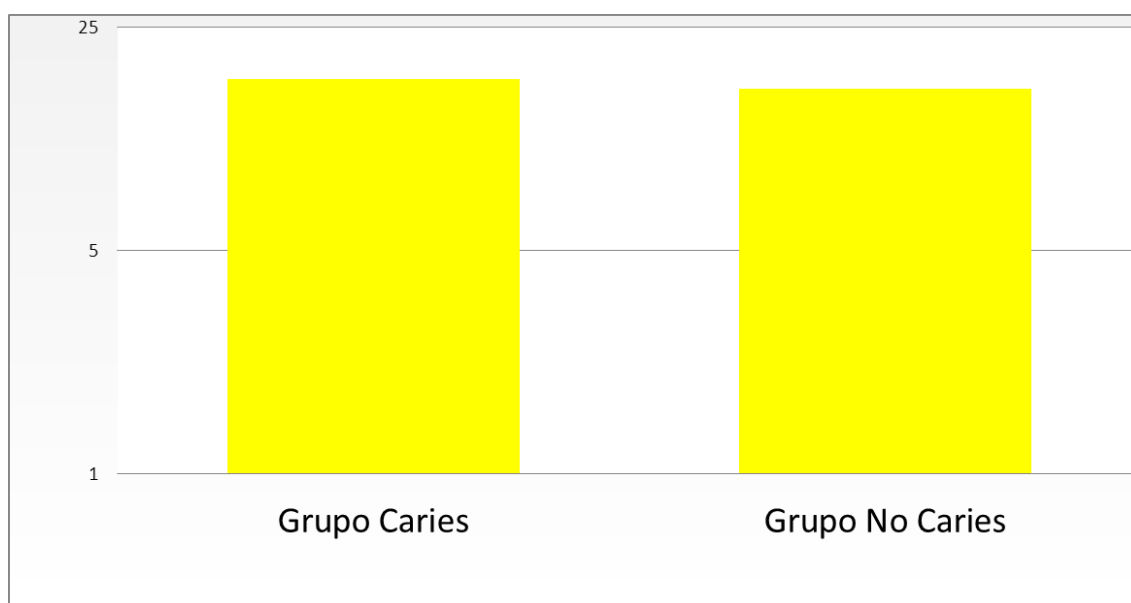


Gráfico 29: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Clearfil Protect Bond®.

4.3.4 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Excite® frente a los grupos CRIES- NO CRIES.

En el caso del adhesivo de grabado total Excite® ($p=0,0442$) se encuentran diferencias, aunque de un modo leve, entre las bacterias no cariogénicas, más sensibles a la acción de dicho adhesivo, y las cariogénicas (Tabla 39, Gráfico 30).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo No Caries	80	8,2445	A
Grupo Caries	40	7,7993	B

Tabla 39: Test *post- hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo de grabado total Excite®.

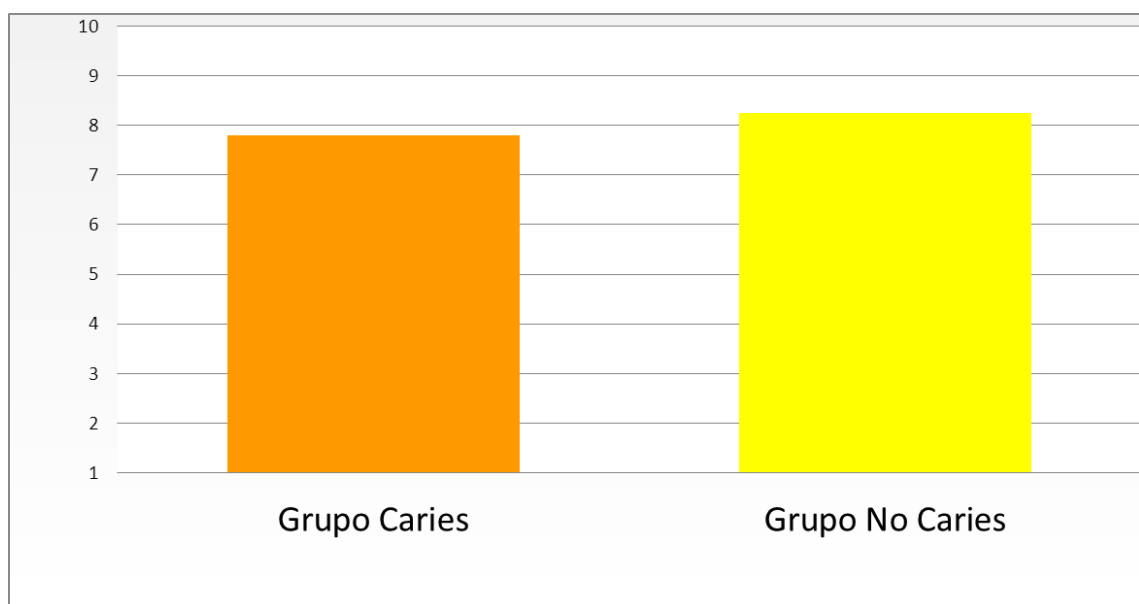


Gráfico 30: Test de Duncan para el adhesivo de grabado total Excite®.

4.3.5 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Futurabond DC® frente a los grupos CARIES- NO CARIES.

El adhesivo autograbante Futurabond DC®, al igual que el control positivo, muestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0053$) entre el grupo CARIES, más sensible, y el NO CARIES, más resistente (Tabla 40, Gráfico 31).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo Caries	40	20,866	A
Grupo No Caries	80	17,822	B

Tabla 40: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Futurabond DC®.

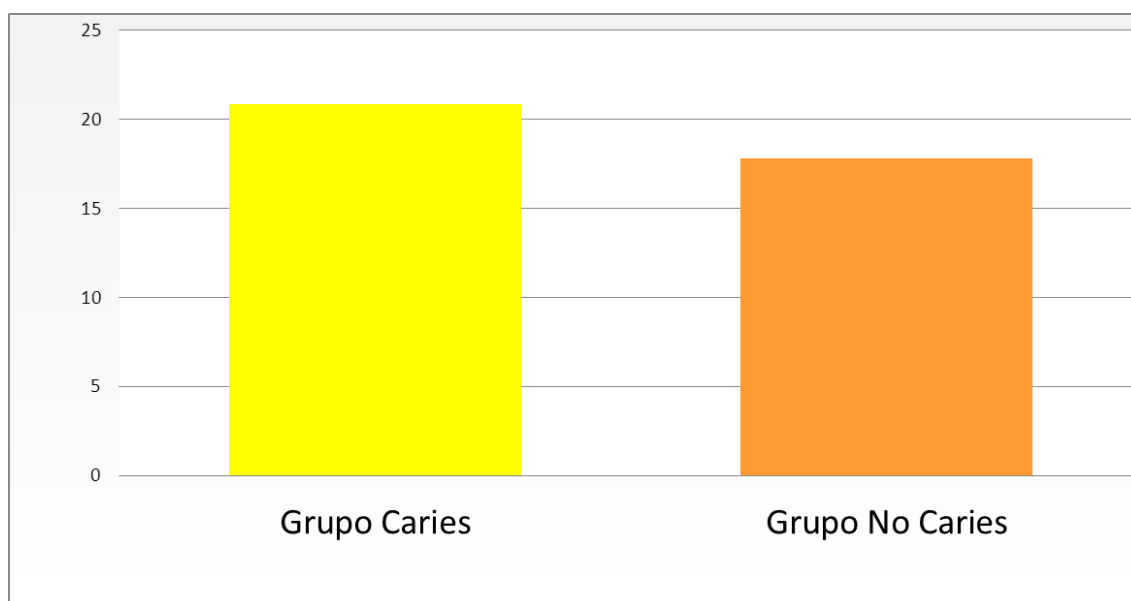


Gráfico 31: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Futurabond DC®.

4.3.6 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para G- Bond® frente a los grupos CRIES- NO CRIES.

El test de ANOVA también halla diferencias entre los grupos para el adhesivo autograbante de un paso G- Bond® ($p=0,0003$), siendo el grupo NO CRIES estadísticamente más sensible que los microorganismos asociados con la caries (Tabla 41, Gráfico 32).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo No Caries	80	12,0402	A
Grupo Caries	40	9,1466	B

Tabla 41: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante G-Bond®.

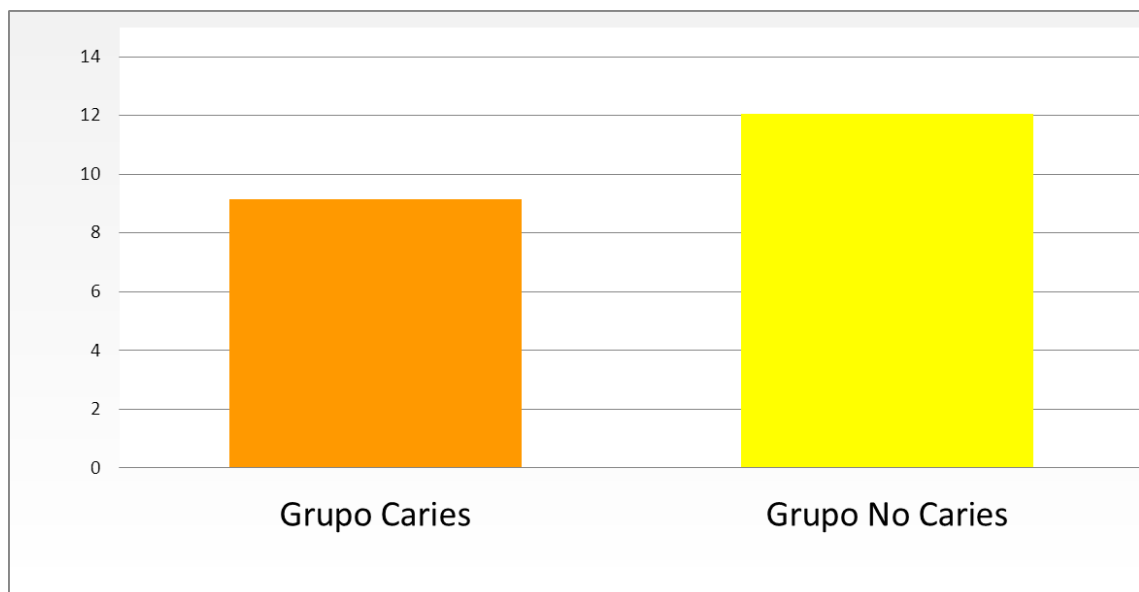


Gráfico 32: Test de Duncan para el adhesivo autograbante G- Bond®.

4.3.7 ANOVA Unifactorial y test de Duncan para Xeno V® frente a los grupos CRIES- NO CRIES.

En el caso del adhesivo Xeno V® tampoco hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0,2559$), aunque el efecto es ligeramente mayor frente a las bacterias no cariogénicas (Tabla 42, Gráfico 33).

Grupo de bacterias	n	Media (mm)	Agrupamiento Duncan
Grupo No Caries	80	10,1651	A
Grupo Caries	40	9,6825	A

Tabla 42: Test *post-hoc* de Duncan de los valores de diámetro de inhibición para el adhesivo autograbante Xeno V®.

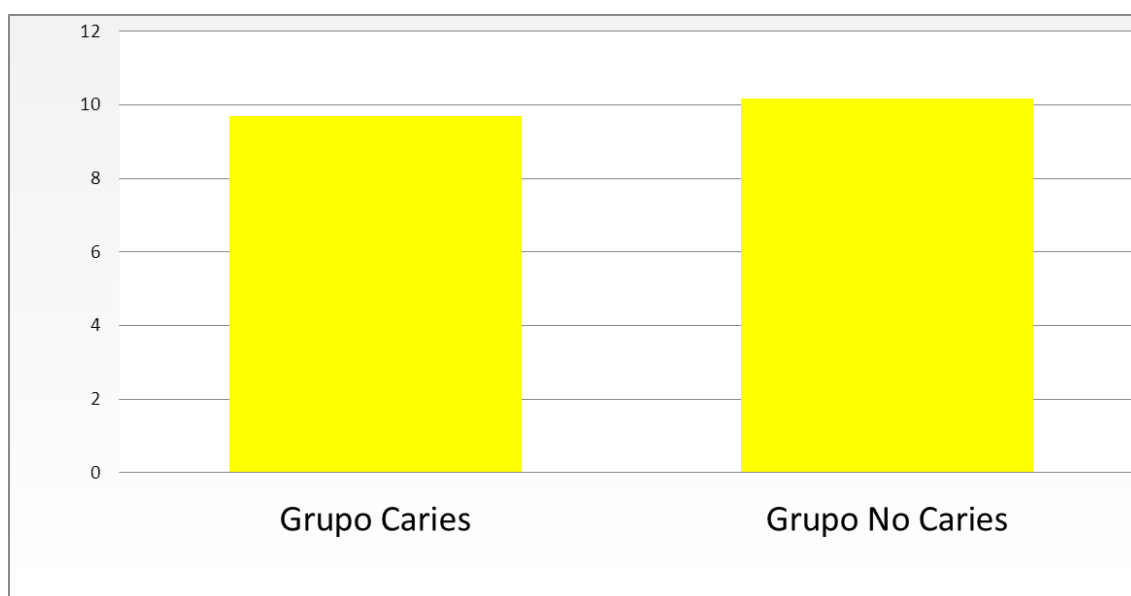


Gráfico 33: Test de Duncan para el adhesivo autograbante Xeno V®.

5. RESULTADOS DE PH Y PRUEBAS DE CORRELACIÓN CON HALOS DE INHIBICIÓN

Los valores de pH obtenidos de los siete productos sin polimerizar se muestran en la Tabla 43. El pH de los primers de los adhesivos autograbantes oscila según su acidez sea de tipo fuerte ($\text{pH} < 1$), moderada ($\text{pH} = 1-2$) o leve ($\text{pH} > 2$)¹⁷⁴.

Producto	pH	Acidez
Adhe SE One F®	2	Moderada
Clearfil Protect Bond®	2	Moderada
Clorhexidina 2%	6	
Excite®	4	
Futurabond DC®	1	Fuerte
G- Bond®	3	Leve
Xeno V®	1	Fuerte

Tabla 43: Valores de pH y clasificación de acidez de los adhesivos autograbantes

El test de correlación de Spearman confirma la ausencia de asociación entre los valores de pH y el diámetro de los halos de inhibición generados por los distintos productos (Tabla 44). El valor del estadístico de Spearman es muy bajo y en absoluto significativo.

Variable	Estadístico de Spearman	p
pH	0,12729	0,7856

Tabla 44: Test de Correlación de Spearman entre los valores de pH de los distintos adhesivos y los halos de inhibición generados.

6. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) PARA CADA PRODUCTO Y CORRELACIÓN CON HALOS DE INHIBICIÓN

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante difusión en agar para el cálculo de la CMI se muestran en la Tabla 45. Los valores se indican en mg/l.

	Adhe SE One F®	CPB®	Excite®	Futurabond DC®	G- Bond®	Xeno V®	CHX 2%
<i>Actinomyces naeslundii</i>	280000	11000	1066000	31,05	550000	352663,14	78
<i>Bacillus subtilis</i>	11200	11000	266500	103,5	275000	10580	125
<i>Candida albicans</i>	1120000	550000	1066000	5175	550000	1058000	90
<i>Enterococcus faecalis</i>	1120000	550000	1066000	5175	1100000	211600	125
<i>Escherichia coli</i>	11200	1100000	1066000	258750	1100000	10580	125
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1120000	5500	1066000	3415,5	366663	1058000	312
<i>Lactobacillus casei</i>	1120000	5500	1066000	1035	550000	1058000	312
<i>Micrococcus luteus</i>	11200	3666,66667	533000	5175	1100000	10580	14,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	373333,3333	11000	1066000	3415,5	550000	1058000	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	560000	5500	1066000	3415,5	1100000	5290	125
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11200	11000	1066000	5175	366663	264500	125
<i>Streptococcus mutans</i>	1120000	11000	1066000	341,55	1100000	529000	78

Tabla 45: CMI (mg/l) de cada uno de los productos frente a cada uno de los microorganismos evaluados

Los resultados de las pruebas de correlación de Spearman entre los valores obtenidos en los halos de inhibición y los valores de CMI indican la existencia de una correlación estadística negativa fuerte y altamente significativa tanto para la totalidad de las muestras como para la mayoría de los microorganismos y los adhesivos evaluados tal y como se muestra en la Tabla 46.

Las pruebas confirman la existencia de correlación estadística para siete de las doce cepas incluidas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mutans*) y para cuatro de los adhesivos (Adhe SE One F®, Clearfil Protect

Bond®, Futurabond DC® y Xeno V®), obteniendo valores próximos a la significación para el resto.

Variable	Estadístico de Spearman	p
GLOBAL	-0,80473	<0,0001
<i>Actinomyces naeslundii</i>	-0,67857	0,0938
<i>Bacillus subtilis</i>	-0,78591	0,0362
<i>Candida albicans</i>	-0,61079	0,1451
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0,8895	0,0073
<i>Escherichia coli</i>	-0,63647	0,1243
<i>Lactibacillus acidophilus</i>	-0,85244	0,0148
<i>Lactobacillus casei</i>	-0,7881	0,0353
<i>Micrococcus luteus</i>	-0,63647	0,1243
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-0,85244	0,0148
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,01802	0,9694
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-0,90094	0,0056
<i>Streptococcus mutans</i>	-0,92656	0,0027
Adhe SE One F®	-0,58392	0,0462
Clearfil Protect Bond®	-0,69176	0,0127
Clorhexidina 2%	-0,53497	0,0731
Excite®	-0,56981	0,0531
Futurabond DC®	-0,58441	0,046
G-Bond®	-0,55174	0,0629
Xeno V®	-0,66688	0,0179

Tabla 46: Valores del Test de Correlación de Spearman entre los valores de CMI y los halos de inhibición de las distintas variables.

—● DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Uno de los retos de la odontología conservadora consiste en el mantenimiento a largo plazo de las restauraciones, libres de recidivas de caries en los márgenes cavitarios. El hecho de que los materiales empleados en las restauraciones tengan efecto antibacteriano puede contribuir a la desinfección y dificultar la progresión o la recidiva de la caries. Los sistemas adhesivos se emplean no solo en las restauraciones de lesiones cariosas sino también en el cementado de brackets, restauraciones indirectas o postes intrarradiculares, donde se enfrenta a distintos ecosistemas bacterianos, con microorganismos de variada naturaleza y capacidad patogénica. Por ello, hemos decidido enfrentar estos adhesivos a microorganismos no solo cariogénicos sino también causantes de patología periodontal o pulpo- periapical o incluso transeúntes de la cavidad oral.

La selección de microorganismos es compleja, ya que implica elegir entre las más de 700 especies que se localizan en la cavidad oral, ya sea como patógenos (obligados u oportunistas), transeúntes, comensales, saprofíticos o mutualistas. En nuestro estudio hemos decidido seleccionar un amplio rango de doce microorganismos, que difieren tanto en su naturaleza patogénica como en su comportamiento frente a pH, temperatura o condiciones atmosféricas. Elegimos aquellas bacterias ampliamente relacionadas con el desarrollo y progresión de caries (*Streptococcus mutans*^{37,38}, *Actinomyces naeslundii*^{71,72,73}, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*^{45,139} o *Candida albicans*^{43,141}) o con la enfermedad periodontal (*Pseudomonas aeruginosa*¹¹⁰, *Enterococcus faecalis*^{114,115}, *Actinomyces*

naeslundii^{76,77}, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*⁹¹). También hemos incluido otros microorganismos que aun no siendo patógenos, se comportan como contaminantes habituales⁹³, o como transeúntes de la cavidad oral como *Escherichia coli*^{83,101}, *Micrococcus luteus*¹²⁴ o *Bacillus subtilis*¹²³. Existe evidencia de la presencia de estos microorganismos en los túbulos dentinarios¹⁷⁹ o incluso en el propio espesor de la capa híbrida²¹⁸. Algunas de estas especies no patógenas pueden generar unas condiciones favorables para el desarrollo o la supervivencia de otras bacterias propiamente patógenas, o bien afectar a la durabilidad de la unión química entre los adhesivos y el sustrato dental, pudiendo llevar al fracaso del tratamiento. Además, el empleo de adhesivos autograbantes incluye un gran número de situaciones clínicas, relacionadas con distintos ecosistemas bacterianos, y por lo tanto con distintos tipos de microorganismos, haciendo conveniente no limitar la selección de los mismos a las bacterias cariogénicas.

Al igual que la mayoría de estudios *in vitro*, hemos elegido microorganismos de la serie ATCC (American Type of Culture Collection, Estados Unidos), la más habitual por su extensión en la literatura. Optamos por emplear bacterias de colección para la investigación con cultivos celulares porque es una técnica estándar que garantiza la identificación de la línea celular empleada, la cantidad de microorganismos sembrada sobre las placas, evita cepas con desarrollo de mecanismos de resistencia y facilita que los cultivos estén libres de contaminación por otros patógenos, así como porque permite comparar los resultados con los de otros trabajos.

Al realizar ensayos experimentales para conocer la capacidad antibacteriana de adhesivos dentinarios o materiales de obturación, muchos trabajos evalúan su eficacia exclusivamente frente a *Streptococcus mutans*, como los de los grupos de investigación de Imazato et al.^{214,216,231}, Elsaka et al.^{192,213} o Türkün et al.^{165,234}. En otros se incluyen, como en nuestro caso, un número más amplio de microorganismos, pero solo aquellos relacionados con la caries dental, como *Lactobacillus* o *Actinomyces*, como los trabajos de Imazato et al.^{202,232}, Weng et al.¹⁹¹ o Brandt et al.^{228,235}. En nuestra investigación hemos elegido no solo las bacterias cariogénicas por excelencia, sino que hemos incluido otros microorganismos que forman parte de la microbiota habitual y que pueden estar presentes en los tratamientos restauradores. Hay diversas situaciones clínicas en las que se emplean adhesivos autograbantes que justifican el empleo de otras bacterias además de las cariogénicas. En los cementados de restauraciones protésicas, los adhesivos van a estar enfrentados a los microorganismos presentes en la placa bacteriana supra o subgingival, así como con las que se localicen en el fluido crevicular, sean o no patógenas. En el cementado de postes intrarradiculares, deben sellar una dentina radicular que puede estar contaminada con las bacterias que habían contaminado la pulpa antes de realizar el tratamiento de conductos. En el cementado de aparatología ortodóncica se van a enfrentar a todo microorganismo que forme parte de la microbiota oral, así como al desafío de evitar la desmineralización periférica por bacterias cariogénicas.

El empleo de adhesivos logra reducir la filtración bacteriana a través de los túbulos dentinarios, fundamentalmente debido al sellado realizado en la dentina^{171,196}. Aunque no está claro si la permanencia del barrillo dentinario reduce la presencia de

bacterias o si por el contrario incrementa su adherencia, sí está demostrado que los adhesivos autograbantes están asociados con una mayor reducción de colonias bacterianas que los de grabado total sin realizar una técnica de grabado ácido previo. Las resinas compuestas ya han demostrado en otros estudios (Karanika- Kouma et al.⁵, Herrera et al.⁶,) que no son capaces por si solas de generar esta inhibición, salvo cuando se les modifica su composición con clorhexidina (Cheng et al.¹⁸⁹), poliácidos (Meiers et al.⁸) o el monómero de amonio cuaternario MDPB (Thomé et al.²¹⁵).

Todas las características de los adhesivos autograbantes (composición, pH, mecanismo de polimerización o número de pasos clínicos) tienen cierta influencia tanto sobre las propiedades físicas como sobre la capacidad inhibitoria del crecimiento de microorganismos. A la hora de comparar entre un amplio número de adhesivos autograbantes debemos tener en cuenta todos esos factores. En cuanto al número de pasos clínicos elegimos adhesivos de uno (G-Bond®, Xeno V® o Adhe SE One F®) y dos pasos (Futurabond DC® o Clearfil Protect Bond®) para valorar si existen diferencias entre ellos. Las últimas revisiones han demostrado que parece que un mayor número de pasos clínicos está asociado con una mejoría de las prestaciones clínicas en cuanto a pérdida de retención de las restauraciones o a su fuerza de unión a la dentina. Una mejoría en las propiedades antibacterianas de los adhesivos de dos pasos los colocaría en clara ventaja frente a los preparados monocomponente.

En cuanto al pH, hemos incluido adhesivos autograbantes con valores de acidez muy dispares, desde valores en torno a 1 para Futurabond DC® o Xeno V® hasta valores próximos al de adhesivos de grabado total, como es el caso de G- Bond®, con

un pH de 3. De esta manera podemos tratar de confirmar la ausencia de correlación entre el pH de los adhesivos y su capacidad inhibitoria que promueven autores como Hedge et al.²²⁶ o Korkmaz et al.²³³.

En cuanto a la composición química de los monómeros, hemos tenido en cuenta dos aspectos: por un lado, elegir adhesivos de base metacrilato, como G-Bond®, y de base metacrilamida, como Adhe SE One F® o Xeno V® debido a que en los estudios de Salz et al.^{277,278} se demostró que los de base metacrilamida obtenían mejores tasas de fuerza de unión a la dentina, lo cual parecería asociado a una mayor tasa de éxito; por otro lado, incluir adhesivos autograbantes que contaran con productos que incrementaran su capacidad antibacteriana. En primer lugar, seleccionamos un adhesivo modificado con grupos fluoruros, Adhe SE One F®, que ha demostrado mejorar las propiedades antibacterianas (Da Silva et al.²⁴²) manteniendo una adecuada fuerza de unión a la dentina según El Deeb et al.²⁷⁹. En segundo lugar elegimos un adhesivo autograbante comercializado con un monómero específicamente antibacteriano, Clearfil Protect Bond®. La inclusión de MDPB incrementa el efecto antimicrobiano desde los ensayos piloto de Imazato et al.²¹⁴ logrando reducir la progresión de lesiones de caries tanto bajo condiciones *in vitro*^{249,250} como *in vivo*^{221,242}. Además, es capaz de inhibir la desmineralización periférica *in vitro* sobre lesiones de caries radiculares²³⁰. Consideramos muy interesante evaluar si el efecto inhibitorio de este adhesivo comercial es superior o no al de otros adhesivos sin componentes propiamente antibacterianos o al efecto generado por un antiséptico control.

Por último, la técnica de polimerización de los adhesivos también tiene cierta influencia sobre sus propiedades tanto físicas como químicas. Hemos elegido un adhesivo autograbante con polimerización dual, Futurabond DC®, no sometiéndolo a fotopolimerización. De este modo, se pueden corroborar las conclusiones de Imazato et al.²⁰², Gondim et al.²⁰³ o Duque et al.²⁰⁴ según las que la ausencia de fotopolimerización incrementaría los valores de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para poder comparar el efecto de los adhesivos autograbantes al de un producto de referencia elegimos el digluconato de clorhexidina como control, por su conocida capacidad bactericida rompiendo la membrana bacteriana de multitud de microorganismos²³⁹. En estudios similares, se emplea en concentraciones que oscilan entre el 0,2% y el 7'5%. Elegimos una concentración del 2%, frecuentemente empleada como irrigante en endodoncia, validada para desinfectar la dentina¹⁸⁶, que ha demostrado una actividad antimicrobiana mayor a la de otros desinfectantes como el hipoclorito de sodio o el hidróxido de calcio²⁶². En estudios similares al nuestro como los de Cehreli et al.²⁰⁰, Baseren et al.²⁰¹, Gondim et al.²⁰³ o Esteves et al.²³⁹, emplean concentraciones menores (0,12-1%), cuyos valores de inhibición son igualmente inferiores a los de los adhesivos autograbantes con los que lo comparan.

La metodología empleada en este estudio es fácilmente comparable con la de estudios similares. Desde la técnica de difusión en agar, que es la prueba estándar reconocida por el Comité Europeo en Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) para el análisis del efecto antimicrobiano de cualquier producto, hasta el medio de cultivo empleado, agar BHI, que está igualmente validado y permite

comparar con los resultados de otros estudios^{216,245}. Elegimos el medio BHI por ser un medio en el que crecen la mayoría de microorganismos con mucha facilidad y rapidez, además de permitirnos observar con claridad los halos de inhibición por haber mucho contraste entre las zonas de inhibición y las zonas con presencia de colonias. Sin embargo, dos de las cepas incluidas en el estudio, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, precisan para su adecuado crecimiento emplear el medio de cultivo específico MRS, facilitando la observación de los halos de inhibición.

La determinación de la CMI de los adhesivos autograbantes no puede ser realizada mediante tiras reactivas de E-test, las cuales solo están comercializadas para algunos antibióticos. Al no existir dichas tiras, es necesario realizar una técnica de dilución de los adhesivos, capaz de reducir su concentración sin influir en la capacidad inhibitoria. Al igual que en el ensayo de Ma et al.²⁸⁰, en el que diluían los monómeros antibacterianos MDPB y DMAE-CB para valorar la concentración necesaria para detener el crecimiento de microorganismos, elegimos el agua destilada como disolvente de nuestros adhesivos por no alterar sus propiedades antibacterianas.

Hay muy diversos métodos para valorar la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de materiales odontológicos. No existe consenso en la literatura sobre si la técnica de medición tiene o no influencia en los resultados obtenidos. Mientras que autores como Imazato et al.²⁰², Hedge et al.²²⁷ o Feuerstein et al.²²⁹ encuentran diferencias entre las pruebas de difusión en agar, de microdilución o de contacto directo, los estudios de Türkün et al.²²⁵ y Pinto et al.^{240,241} hallan resultados similares independientemente de la técnica llevada a cabo. En nuestro estudio, al combinar la

medición de los halos de inhibición con el análisis de las CMI, podemos comparar los resultados de dos técnicas y confirmar si existe o no correlación entre si.

Hay varios estudios que analizan la influencia del pH en la capacidad inhibitoria de los adhesivos autograbantes^{213,227}. Dependiendo de la naturaleza de los microorganismos, unos serán más sensibles a valores de pH muy alcalinos mientras que otros lo serán frente a antibacterianos de naturaleza ácida. De hecho, para algunos microorganismos existe mucha controversia en cuanto a la sensibilidad al valor de pH. Teóricamente, *Enterococcus faecalis* es sensible solo en medios con valores de pH superiores a 11,5²⁶⁴; sin embargo, al enfrentarlo a soluciones de hipoclorito de sodio, su efecto es mayor cuanto mayor sea su acidez²⁶³. La mayoría de los estudios en los que se correlacionan la acidez y la capacidad inhibitoria no encuentran asociación entre las dos variables^{202,226,229,233}, como en nuestro caso. De todos ellos, solo el estudio de Feuerstein et al.²²⁹ realiza mediciones de pH propias con la ayuda de una sonda de pH antes de la polimerización, inmediatamente después de aplicar la luz y 24 horas después de ella. Confirman que el valor del pH va cambiando, con los valores más ácidos antes de la polimerización. El resto de estudios toman el valor aportado por las casas comerciales para evaluar la correlación acidez- capacidad inhibitoria. Nuestros valores de pH se midieron previamente a la polimerización de los adhesivos, obteniendo valores similares a los del resto de estudios. La técnica de medición mediante tiras de papel reactivas es una alternativa validada por la literatura, suficientemente precisa, siempre y cuando venga precedida de una fiabilidad intraobservador suficiente.

La realidad clínica *in vivo* dista mucho de las condiciones *in vitro* planteadas en este estudio de investigación; la presencia de proteínas salivales influye en la adhesión y permanencia de bacterias sobre las superficies orales, reduciendo el efecto antibacteriano propio de los materiales testados. Además, la acidez de los primers de los adhesivos autograbantes se ve neutralizada al aplicarse sobre la dentina, limitando el efecto basado en su potencial ácido. En nuestra investigación no hemos tenido en cuenta las variables biológicas, con lo que las condiciones que se extraen deben tener en consideración las limitaciones del estudio, haciendo conveniente realizar estudios posteriores para validar los resultados obtenidos.

Los gráficos de interacción (Gráfico 2, Gráfico 23) ofrecen una interpretación muy similar. En ambos casos existe un gran disparelismo y entrecruzamiento de las líneas que representan la capacidad inhibitoria de los adhesivos. Al realizar el test de ANOVA bifactorial en el que se incluyen las dos variables a la vez (CEPA y PRODUCTO), se confirma la potente interacción entre ellas, debido a la fuerte interacción existente al asociarlas en el cociente $CEPA*PRODUCTO$ ($p<0,0001$) (Tabla 6, Tabla 31), impidiendo analizarlas de un modo conjunto. En base a nuestros resultados, las dos variables tienen su influencia en el efecto antibacteriano, y no podemos valorarlas de modo conjunto mediante el ANOVA bifactorial. Aunque renunciar a este ANOVA bifactorial provoca un descenso en la potencia estadística de los datos por reducir el número de muestras en cada grupo de análisis, nos permite sin embargo conocer de un modo más certero la influencia de cada una de las variables por separado en la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Los tests *a posteriori* de Duncan nos sirven para localizar las diferencias entre los grupos, definiendo al microorganismo más sensible

(*Micrococcus luteus*) y al más resistente (*Escherichia coli*) a la acción de los adhesivos (Tabla 8) así como al adhesivo más potente (Futurabond DC®) y al de menor capacidad inhibitoria (Excite®) (Tabla 7). Donde no podemos hallar diferencias es en el agrupamiento bacteriano según la relación con la caries dental; la sensibilidad de los grupos a la acción de los adhesivos es similar ($p=0,058$), aunque los microorganismos cariogénicos se mostraron más sensibles que los del grupo NO CARIES (Tabla 31).

Las doce pruebas de ANOVA unifactorial para cada una de las cepas ofrecen el mismo valor de p ($p<0,0001$) (Tabla 9), existiendo por tanto diferencias estadísticamente significativas entre los adhesivos empleados. Queda por lo tanto descartada la primera hipótesis nula que nos planteamos en nuestro estudio, encontrando diferencias en la actividad inhibitoria de los siete productos incluidos en este trabajo. En la mayoría de las bacterias, la clorhexidina al 2% confirma su papel como control positivo, ejerciendo como el producto con mayor capacidad inhibitoria (*Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus mutans*). Esta gran capacidad inhibitoria coincide con los valores obtenidos en los estudios de Leonardo et al.^{259,260} o Atac et al.⁴. Esta elevada capacidad inhibitoria por parte de la clorhexidina apoya la idea de realizar previamente al sellado de una cavidad o al cementado de una restauración o un perno intrarradicular, una limpieza y desinfección con clorhexidina al 2%; o incluso abre la posibilidad de crear adhesivos modificados con clorhexidina que incrementen su efecto antibacteriano sin alterar el resto de propiedades físicas y químicas. Por el contrario, el adhesivo de grabado total Excite® se comporta como un producto con muy escasa capacidad antibacteriana, siendo el producto que genera los menores

halos inhibitorios entre los microorganismos evaluados. Nuestros resultados para Excite® coinciden con los obtenidos por Duque et al.²⁰⁴ o Du et al.²¹². A diferencia de estos estudios y del nuestro, Atac et al.⁴ encuentran valores de inhibición muy diferentes, aunque pequeños, entre tres adhesivos de un paso de grabado total y hasta nueve microorganismos diferentes. Es importante remarcar el hecho de que no realizamos una técnica de grabado con ácido ortofosfórico previa a la colocación del adhesivo no autograbante Excite® sobre los discos. La secuencia clínica habitual sí incluye el empleo de dicho gel ácido, que podría generar un efecto inhibitorio en los microorganismos presentes en el sustrato dentario, independientemente del adhesivo de grabado total evaluado. Las diferencias en la sensibilidad de los doce microorganismos a la acción de este adhesivo no autograbante son muy escasas, no encontrando ningún tipo bacteriano que se vea suficientemente inhibido por su acción.

Futurabond DC® y Clearfil Protect Bond® se muestran como los adhesivos autograbantes más potentes en cuanto a su capacidad antibacteriana. Futurabond DC® posee un mayor efecto que el adhesivo con MDPB en ocho de las doce cepas estudiadas con diferencias estadísticamente significativas entre ellas (*Actinomyces naeslundii*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mutans*). Pese a haber sido diseñado como un adhesivo autograbante con capacidad inhibitoria para reducir el riesgo de recidiva de caries, otro adhesivo autograbante que no incluye monómeros específicamente antibacterianos es más eficaz que éste en la inhibición de las principales entidades causantes de caries. La ausencia de fotopolimerización o la

diferencia de pH entre ambos podría ser una de las causas de dicha diferencia entre estos productos.

El adhesivo modificado con fluoruros Adhe SE One F[®], del cual se esperaba un marcado efecto antibacteriano por la presencia de grupos fluoruro en su composición, ofrece resultados dispares. Mientras que para algunas cepas como *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* o *Staphylococcus aureus*, se sitúa entre los más potentes antibacterianos, incluso superiores a la clorhexidina, para otros microorganismos presenta un muy leve o casi ausente efecto inhibitorio (*Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus mutans*). Así, aunque la inclusión de los grupos fluoruro pueda ayudar a evitar la desmineralización periférica y con ello la progresión de lesiones de caries, su efecto inhibitorio sobre los principales microorganismos cariogénicos es muy limitado.

Los otros dos adhesivos autograbantes de un paso, G-Bond[®] y Xeno V[®], tienen en casi todas las bacterias un efecto menor al de los adhesivos de dos pasos (salvo G-Bond[®] con *Staphylococcus aureus* y Xeno V[®] con *Escherichia coli*), obteniéndose en algunos microorganismos valores similares o inferiores a los obtenidos con el adhesivo de grabado total Excite[®]. Frente a *Streptococcus mutans*, los valores obtenidos para Xeno V[®] (9,4 mm) son similares a los de Vaidyanathan et al.²²⁷ (9,3 mm). Al igual que en nuestro caso, Esteves et al.²³⁹ demuestran que Adhe SE[®], Xeno IV[®] o G-Bond[®] generan un efecto inferior a los de Futurabond NR[®] o Clearfil Protect Bond[®] frente a *Streptococcus spp.* Este hallazgo confirma el hecho de que los adhesivos autograbantes

de dos pasos, además de contar con mejores propiedades físicas, también poseen una mayor capacidad antibacteriana, que los de un paso, cuyos valores se aproximan a los de los adhesivos no autograbantes sin grabado ácido previo. Bajo las condiciones de nuestro estudio y con el apoyo bibliográfico, parece preferible el empleo de sistemas autograbantes de dos pasos frente a los adhesivos en un solo bote.

Las siete pruebas de ANOVA unifactorial para cada una de los productos evaluados ofrecen el mismo valor de p ($p < 0,0001$) (Tabla 22), existiendo por tanto diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad de los microorganismos a la acción de cada uno de los adhesivos empleados. La potente significación estadística hallada con nuestros valores revela la existencia de grandes diferencias entre los grupos de estudio. De hecho, parece razonable que con esas grandes diferencias encontradas en el efecto antimicrobiano por parte de adhesivos dentinarios hubiéramos podido reducir el número de muestras de nuestro trabajo o incrementar el nivel de significación estadística por encima del 95%.

El adhesivo con fines anticariogénicos Clearfil Protect Bond® no obtiene los resultados esperables en cuanto a su efecto inhibitorio de microorganismos acidófilos. De hecho, *Streptococcus mutans* (13,88 mm), *Lactobacillus acidophilus* (12,20 mm) y *Actinomyces naeslundii* (11,66 mm) son los microorganismos más resistentes a su acción; obteniendo valores adecuados solo para la cepa cariogénica *Lactobacillus casei* (37,53 mm). Los resultados sobre la inhibición de *Streptococcus mutans* por Clearfil Protect Bond® varían mucho en la literatura, con unos valores de diámetro de inhibición que oscilan entre los de Türkün et al.²³⁴ (25,75 mm) y los obtenidos por

Feuerstein et al.²²⁹ (6 mm); el valor obtenido en nuestro estudio (13,88 mm) es más próximo a los de los trabajos de Vaidyanathan et al.²²⁷ (10,2 mm), Gondim et al.²⁰³ (16mm) o Polydorou et al.¹⁶⁵ (17 mm). Los resultados de *Lactobacillus casei* (37,53 mm) son muy superiores sin embargo a los existentes en los trabajos de Duque et al.²⁰⁴ (20,8 mm), Imazato et al.²³² (17,6 mm) o Korkmaz et al.²³³ (18,8 mm) en condiciones similares a las nuestras. En el caso del *Lactobacillus acidophilus*, nuestros resultados (12,20 mm) son inferiores a los de Gondim et al.²⁰³ (18,4 mm) o Korkmaz et al.²³³ (22,4 mm). Aunque no hay un claro consenso en los valores de inhibición bacteriana, sí parece claro que el efecto de este adhesivo “antibacteriano” resulta inferior de lo esperado en los ensayos *in vitro*, no justificándose su empleo en situaciones de alto riesgo de caries por el hecho de contener monómeros antibacterianos.

A pesar de que Futurabond DC® ha demostrado ser el adhesivo autograbante dual sobre el que se genera con mayor facilidad el depósito de biofilms de *Enterococcus faecalis*²⁸¹ por encima de Adhe SE DC® o Excite DSC® e incluso del fotopolimerizable Clearfil Protect Bond®, no hay resultados en la bibliografía con los que comparar los datos obtenidos en nuestro trabajo. Sí que podemos analizar dos trabajos en los que evalúan la actividad antibacteriana del adhesivo autograbante Futurabond NR® (Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania), cuyo efecto es muy inferior sobre *Streptococcus spp.* al de Clearfil Protect Bond® (Esteves et al.²³⁹) y que no presenta ninguna actividad inhibitoria sobre *Lactobacillus spp.* (Korkmaz et al.²³³). En nuestro caso, el adhesivo evaluado es el de polimerización dual sin fotopolimerizar, lo que parece aumentar la actividad inhibitoria. Las escasas diferencias en composición química o pH con el adhesivo fotopolimerizable Futurabond NR® y las grandes diferencias en el efecto

inhibitorio de microorganismos de la cavidad oral, apoya las conclusiones de diversos estudios^{202,203,204}, según los cuales la ausencia de fotopolimerización incrementa el efecto antibacteriano. Así, parece que los adhesivos de polimerización dual pueden ser el adhesivo de elección en aquellas situaciones clínicas en las que se desee un marcado efecto antibacteriano.

La cepa *Actinomyces naeslundii* es la única de las cepas más frecuentemente asociadas con la caries que se ve fuertemente inhibida por los adhesivos autograbantes evaluados, especialmente por Futurabond DC® y Xeno V®. Otras cepas cariogénicas como *Streptococcus mutans* o *Lactobacillus spp.* están entre las más resistentes a la acción de los adhesivos Xeno V®, G- Bond®, Adhe SE One F® o el ya mencionado Clearfil Protect Bond®. El principal microorganismo asociado con el inicio y desarrollo de la caries, *Streptococcus mutans*, se ve no obstante muy fuertemente inhibido por la acción del antiséptico control, más que por ninguno de los adhesivos. Sigue por lo tanto siendo muy recomendable la aplicación de clorhexidina previamente a cualquier técnica adhesiva, ya que su capacidad desinfectante es más eficaz que la de cualquier adhesivo.

Según las agrupaciones de bacterias en base a su patogenicidad, el test de ANOVA unifactorial para la variable GRUPO DE BACTERIAS indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los productos enfrentados tanto al grupo CARIES como al grupo NO CARIES ($p < 0,0001$). Estas combinaciones bacterianas ofrecen unos resultados que deben ser interpretados con limitaciones, ya que las bacterias en agregaciones en forma de biofilms generan unos mecanismos de resistencia que

pueden ser diferentes a los de la suma de las bacterias por separado. En general, la formación de estos biofilms incrementa su resistencia a la acción de cualquier antiséptico. En ambos grupos, el control positivo se comporta como el producto con mayor capacidad inhibitoria con diferencias estadísticamente significativas sobre el resto de los adhesivos. En el caso de los microorganismos cariogénicos, solo dos de los adhesivos autograbantes evaluados, Futurabond DC® y Clearfil Protect Bond®, son capaces de generar halos de inhibición significativamente mayores a los del adhesivo de grabado total Excite®. Así, todos los adhesivos de un paso demostraron una menor capacidad inhibitoria que los de dos pasos. Para el amplio grupo NO CARIES, los resultados fueron más dispares, aunque al igual que en el conjunto anterior, los adhesivos autograbantes de dos pasos, unidos al adhesivo modificado con fluoruros, Adhe SE One F®, mostraron unos valores de inhibición significativamente superiores a los del resto de adhesivos autograbantes o al del adhesivo de grabado total Excite®. Al igual que tras la evaluación del efecto inhibitorio sobre las bacterias por separado, al combinarlas según su capacidad patogénica parece preferible elegir adhesivos autograbantes de más pasos clínicos por sus mejores prestaciones antibacterianas, tanto con microorganismos cariogénicos como con los no relacionados con el desarrollo y avance de caries.

A la vista de los resultados hallados tras la división en los dos grupos bacterianos, no siempre se hallan diferencias estadísticamente significativas entre si. Únicamente en el caso de los dos productos que lideran la capacidad inhibitoria, Futurabond DC® y el digluconato de clorhexidina, el efecto es significativamente mayor con los microorganismos implicados en el desarrollo de caries dental que con el grupo NO

CARIES. Clearfil Protect Bond®, pese a su naturaleza anticaries, no es significativamente más eficaz con los microorganismos cariogénicos que con los no cariogénicos. Este dato sostiene la idea de que hay otros adhesivos autograbantes que, pese a no contar con monómeros antibacterianos en su composición, generan un mayor efecto inhibitorio de las bacterias causantes del desarrollo de caries. En todos los adhesivos de un paso, ya sean autograbantes (Xeno V®, G- Bond®, Adhe SE One F®) o no autograbantes (Excite®), además de presentar un menor efecto inhibitorio, se obtienen mejores resultados sobre microorganismos transeúntes o periodontopatógenos que sobre las cuatro cepas cariogénicas evaluadas. Esto confirma nuestra preferencia por adhesivos autograbantes de dos pasos clínicos frente a los preparados monocomponente, ya que tienen mayor efecto antibacteriano sobre los microorganismos relacionados con la caries.

Los valores de pH obtenidos (Tabla 43) concuerdan con los obtenidos por Feuerstein et al.²²⁹ y con los datos aportados por las casas comerciales empleados en otros estudios^{202,226,227,233}, validando la medición de pH con tiras reactivas de papel siempre precedida de un adecuado entrenamiento por parte del observador. Las pruebas de correlación de Spearman confirman la ausencia de significación en la asociación entre la acidez del producto y su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano, confirmando la segunda hipótesis nula planteada en este trabajo. Nuestros hallazgos coinciden con los de Imazato et al.²⁰², Hedge et al.²²⁶ o Korkmaz et al.²³³, negando la idea preconcebida según la cual el efecto antibacteriano de los sistemas adhesivos se debía a la naturaleza ácida de sus componentes no polimerizados²³¹. Así, citando a Imazato²⁸², podemos concluir que el beneficio generado por la creación de un

ambiente ácido por parte de los adhesivos autograbantes es “limitado” en cuanto a su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Así, el desarrollo de un medio ácido con el empleo de un gel de ácido ortofosfórico al 37% en los sistemas de grabado total, podría no incrementar su capacidad inhibitoria en base a nuestros resultados.

Las pruebas de correlación de Spearman confirman la existencia de una potente correlación negativa entre la CMI y la capacidad inhibitoria de los adhesivos evaluados. Se trata por tanto de una relación inversamente proporcional, según la cual, cuanto menor es dicha concentración, mayor es la capacidad inhibitoria del producto, existiendo una asociación positiva entre ambas técnicas. Se confirma así la conclusión obtenida en los estudios de Imazato et al.^{202,232}, Türkün et al.²²⁵ o Pinto et al.^{240,241}, según la cual la técnica de medición de la actividad inhibitoria, ya sea difusión en agar o cálculo de CMI, no parece tener influencia sobre los resultados obtenidos. Se confirma por tanto la tercera hipótesis nula, según la cual, no hay diferencias entre las dos técnicas de laboratorio para la medición de la actividad inhibitoria de adhesivos autograbantes.

Nuestros resultados son pruebas a muy corto plazo (48 horas) en las que no evaluamos el efecto prolongado de los adhesivos ni su comportamiento bajo condiciones que se asimilen a la realidad clínica. En estudios recientes se ha demostrado que dicho efecto antibacteriano tiene una duración máxima que va de los 2 a los 7 días según la técnica y los adhesivos evaluados^{226,229}. Al preparar adhesivos experimentales modificados con componentes propiamente antibacterianos como el cloruro de cetilpiridinio²⁴⁵, el óxido de zinc²⁴⁸, la furanona¹⁹¹ o el DMAE-CB^{206,207}, el

efecto perdura hasta superar los 196 días. Parece por tanto que aunque los valores de inhibición de los adhesivos modificados con monómeros antibacterianos no sean superiores a los de otros adhesivos, su efecto sí que es más duradero en el tiempo, manteniendo una actividad inhibitoria en la interfase diente- restauración. Además, las pruebas de difusión en agar dan una idea de la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, pero no sobre la capacidad de limitar o reducir el riesgo de desarrollar lesiones de caries. Múltiples estudios han demostrado que Clearfil Protect Bond® es capaz de reducir el riesgo de formación de caries secundarias bajo condiciones *in vitro*^{215,230,240,241} e *in vivo*²⁴⁹, además de ser el único adhesivo que genera una verdadera capa de inhibición de caries junto a la capa híbrida en el estudio bajo microscopía de luz polarizada de Shinohara et al.²³⁸.

El efecto anti- caries no depende exclusivamente de la inhibición de cepas cariogénicas a corto plazo, sino también de la durabilidad de ese efecto inhibitorio, del mantenimiento de un adecuado sellado, de la capacidad de liberación de iones capaces de remineralizar lesiones incipientes. Así, los resultados de nuestro estudio deben ser valorados con limitaciones en cuanto a su aplicación clínica, al no haberse tenido en cuenta todas las variables implicadas en el desarrollo de caries o fracasos adhesivos.

Existen situaciones clínicas de alto riesgo de caries, como los pacientes infantiles, mayores, inmunocomprometidos o en exclusión social, en los que parece interesante tomar una serie de consideraciones a la hora de elegir los materiales a emplear. Necesitamos materiales que sean capaces de inhibir o limitar el crecimiento de los

microorganismos que están presentes en la cavidad oral tras la preparación de cavidades, instrumentación de conductos radiculares o en los márgenes de restauraciones indirectas o aparatología fija ortodóncica. Esto debe ser capaz de incrementar la durabilidad de los tratamientos, reduciendo el riesgo de fracaso o recidiva de caries. La clorhexidina es el producto que ha demostrado en nuestro estudio la mayor capacidad inhibitoria y debe integrarse en los protocolos adhesivos como desinfección previa o desarrollar materiales que la contengan en su formulación para incrementar su acción antibacteriana.

Entre los adhesivos, los sistemas autograbantes han demostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y reducir el riesgo de desarrollo de recidivas de caries bajo restauraciones directas o indirectas o la aparición de lesiones de desmineralización bajo aparatología ortodóncica que conduzcan al fracaso de dichos tratamientos. Por el contrario, los sistemas de grabado total no cuentan con ese efecto inhibitorio por si mismos. Además, parece preferible el empleo de adhesivos autograbantes de dos pasos de polimerización dual, ya que aunque sus propiedades mecánicas son peores a las de los adhesivos de grabado total, su capacidad antibacteriana es mucho mayor y tienen preferencia por los microorganismos cariogénicos.

————● **CONCLUSIONES**

CONCLUSIONES

1. Los adhesivos autograbantes estudiados demostraron una mayor efectividad en la inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados que el adhesivo no autograbante valorado.
2. Los sistemas adhesivos autograbantes de polimerización dual sometidos a polimerización química cuentan con una mayor capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano.
3. La clorhexidina al 2% se comporta como el producto con mayor capacidad inhibitoria para la mayoría de los microorganismos estudiados con valores superiores a los adhesivos autograbantes o de no autograbado evaluados.
4. Las cepas más sensibles a la acción de los adhesivos de autograbado son *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
5. Los microorganismos más frecuentemente asociados con la caries (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*) presentan mayores valores de inhibición que los no asociados con la caries, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

6. No existe correlación entre la acidez de los adhesivos autograbantes y su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano.
7. Bajo las condiciones de nuestro estudio, no se encuentran diferencias entre las dos técnicas de análisis de la capacidad inhibitoria de adhesivos autograbantes, CMI y difusión en agar.
8. Creemos conveniente realizar otro tipo de estudios que nos permitan conocer la durabilidad del efecto antibacteriano de los adhesivos autograbantes, así como localizar el origen de la capacidad inhibitoria de dichos productos.

—● **ABSTRACT**

ABSTRACT

JUSTIFICATION

Adhesive systems are involved not only in the treatment of carious lesions, but also in indirect luted prosthetic restorations, orthodontic appliances or intrarradicular retention fiber posts. In these locations, it is interesting to know not only the inhibitory effect on cariogenic bacteria but also against microorganisms in root canals located in the sub and supragingival plaque or in crevicular fluid. Thus, it is interesting to consider expanding the range of bacterial strains under study comparing the effect on cariogenic and non-cariogenic bacteria, in order to get a comprehensive understanding of its antibacterial effect on a selection of the microbiology of the oral cavity.

WORKING HYPOTHESIS

Self-etching adhesives have been shown to inhibit bacterial growth. Attempts to improve the inhibitory capacity by incorporating specific antibacterial components do not always produce an increase in bactericidal activity in the reviewed literature. We propose that self-etching adhesives are able to inhibit the growth of oral cavity bacteria more efficiently than a total etch adhesive.

The null hypothesis is that there are not differences between five self-etching adhesives, an etch- and- rinse adhesive and an antiseptic on the growth of microorganisms. In addition, we confirm the absence of positive correlation between the acidity of the adhesives and their inhibitory ability, and the absence of differences between two antibacterial activity tests.

OBJECTIVES

1. To determine and compare the inhibitory capacity of five dentinal self-etching adhesives, an etch- and- rinse adhesive and 2% chlorhexidine against the growth of bacterial strains of the oral cavity.
2. To determine the sensitivity of oral bacteria to the action of dentinal adhesives.
3. To compare the inhibitory effect generated by dentinal adhesives and an antiseptic with the microorganisms commonly associated with the development of caries over other non- pathogen microorganisms.
4. To check the association between the acidity of the primers and their ability to inhibit bacterial growth.
5. To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC value) of each product against each bacteria.
6. To check the correlation between two antimicrobial activity tests: disk- diffusion agar assay and MIC determination.

MATERIALS

Five self-etching adhesives (Futurabond DC®, Adhe SE One F®, Xeno V®, GC G-Bond®, Clearfil Protect Bond®), an etch- and- rinse adhesive (Excite®) and 2% chlorhexidine digluconate as positive control. Twelve strains of bacteria located in the oral cavity were evaluated for antimicrobial activity: *Escherichia coli* (ATCC 1995), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1798), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29292), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104) and the yeast *Candida albicans* (ATCC 18804).

METHODS

1. Agar diffusion method.

An agar- diffusion assay was carried out with a total of 840 samples to measure the diameter of the bacterial growth inhibition halo after 48 hours of incubation under controlled atmosphere and temperature. We designed a distribution into twelve 10-sample groups, one for each microbial strain. Petri plates were prepared with 15 ml of agar and seeded with 100 microliters of suspension of the microorganism according to the 0.5 McFarland scale ($\approx 1.5 \times 10^8$ CFU / ml). Brain Heart Infusion (BHI) agar broth was used as growth medium, except for strains *Lactobacillus acidophilus* and

Lactobacillus casei, seeded in the selective medium of De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth.

Distribution was performed with the bacterial suspension using a sterile loop and suction under ultraviolet light. Uniform distribution plates were allowed to dry for 1 hour before placing sensitivity discs.

Once dried, a sensitivity paper disc (SensiDisc[®]) was placed on Petri dishes, as focused as possible. Then, using a micropipette, discs were filled with 20 microliters of selected products: Futurabond DC[®] (Voco), Adhe SE One F[®] (Ivoclar Vivadent), Xeno V[®] (Dentsply Maillefer), GC G-Bond[®] (GC), Clearfil Protect Bond[®] (Kuraray), and an etch-and-rinse dentin adhesive (Excite[®], Ivoclar Vivadent) and chlorhexidine digluconate 2% as a positive control. All products, except Futurabond DC[®] (Voco) and chlorhexidine digluconate 2% were subjected to 10 seconds of light curing by Elipar Free Light 2[®] (3M ESPE) under an intensity of 1,000 mW/cm².

2. pH determination

pH determination was carried out by paper sticks 0,0-6,0 (Sigma[®]). 5µl of every adhesive were plated over the reactive sticks, and were checked by one evaluator without light curing. Three samples were analyzed in duplicate for each adhesive. Average value was registered for statistical analysis

3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

A new agar diffusion assay was carried out to determine the MIC value. A gradient concentration of every adhesive was evaluated under the same conditions than in the first procedure (atmosphere, time and growth medium). The minimum concentration able to inhibit growth of the microorganism evaluated (mg / l) was the one in which the halo appeared smaller and that no further dilution produced halo after 48- hour incubation.

4. Statistical analysis

It was performed by inferential analysis of variance test (ANOVA) and post-hoc Duncan's tests to find the location of the differences between groups. These tests are carried out both in a two-way, grouping all samples and isolating the variable microorganism or variable adhesive as in a one- way manner for each microorganism against the seven products evaluated.

RESULTS

By analysis of the variable STRAIN, every product showed statistically significant differences among them. In terms of inhibitory capacity, we found that 2% chlorhexidine was the greatest agent, followed by self- etching dual- curing adhesive Futurabond DC®. After them, the self- etching adhesive modified with antibacterial

monomers Clearfil Protect Bond®, followed by Adhe SE One F®, G-Bond®, Xeno V® and finally the etch- and- rinse adhesive Excite®.

When evaluating the pH, the Spearman correlation test confirmed the lack of association between the acidity and the diameter of the zones of inhibition produced by the different products. The Spearman statistical value (0,12729; $p=0,7856$) was very low and not statistically significant.

In terms of MIC values, the results evidenced a negative and highly statistically significant correlation between the two tests: MIC and agar- diffusion for most adhesive- microorganism combinations evaluated.

CONCLUSIONS

1. Self- etching adhesives showed greater effectiveness in inhibiting the growth of microorganisms than the total-etch adhesive.
2. The self-etching dual- curing adhesives are the adhesives with greater inhibitory activity.
4. The 2% chlorhexidine is the greatest inhibitor agent for most of the microorganisms evaluated over self-etching adhesives tested.
6. *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are the most sensitive strains to the adhesive's action.

7. The microorganisms most frequently associated with caries (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) have higher inhibiting values than non-associated with caries, although the differences are not statistically significant.

7. There is no correlation between the acidity of the adhesives and its bacterial growth inhibiting ability.

8. Under the conditions of our study, no differences were found between the two analysis techniques, MIC determination and agar- diffusion assay.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry—a review FDI commission project 1-97. *Int Dent J.* 2000;50:1–12.
 - ² Splieth C, Bernhardt O, Heinrich A, Bernhardt H, Meyer G. Anaerobic microflora under Class I and Class II composite and amalgam restorations. *Quintessence Int.* 2003;34:497-503.
 - ³ Walter R, Duarte WR, Pereira PN, Heymann HO, Swift EJ Jr, Arnold RR. In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. *Oper Dent.* 2007; 32:388-93.
 - ⁴ Atac AS, Cehreli ZC, Sener B. Antibacterial activity of fifth-generation dentin bonding systems. *J Endod* 2001; 27:730-3
 - ⁵ Karanika-Kouma A, Dionysopoulos P, Koliniotou-Koubia E, Kolokotronis A. Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins. *J Oral Rehabil.* 2001; 28:157-60.
 - ⁶ Herrera M, Castillo A, Bravo M, Liébana J, Carrión P. Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer cements and a compomer in contact with dentin caries samples. *Oper Dent.* 2000; 25:265-9.
 - ⁷ Herrera M, Carrión P, Bravo M, Castillo A. Antibacterial activity of four dentin bonding systems. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 15:305-9
 - ⁸ Meiers JC, Miller GA. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, and polyacid-modified composite resins. *Oper Dent.* 1996; 21:257-64.
 - ⁹ Tanaka J, Tanaka M, Kawazoe T. Longitudinal research on the oral environment of elderly wearing fixed or removable prostheses. *J Prosthodont Res.* 2009;53:83-8.
 - ¹⁰ Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:27-39.
 - ¹¹ Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25:190-9.
 - ¹² Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11:6-9.
 - ¹³ Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod.* 2009;35:78-81.
 - ¹⁴ Negroni M. Enfermedades bacterianas. 1ª parte *Estreptococos*. En: Negroni M. *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica.* 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.347-52.
 - ¹⁵ Liébana J, Castillo AM, Rodríguez- Avial C. Género *Streptococcus* y bacterias relacionadas. En: Liébana J. *Microbiología oral.* 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.325-44.
 - ¹⁶ Chedid NR, Bourgeois D, Kaloustian H, Baba NZ, Pilipili C. Caries prevalence and caries risk in a sample of Lebanese preschool children. *Odontostomatol Trop.* 2011;34:31-45.
 - ¹⁷ Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M, Smith DJ. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Res.* 2011;45:377-85.
 - ¹⁸ Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. *Int Dent J.* 2007;57:445-51.
 - ¹⁹ Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles G, Li Y. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Investig.* 2011;15:461-9.
 - ²⁰ Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V. Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Res.* 2010;44:402-7.
 - ²¹ Wennhall I, Matsson L, Twetman S. Salivary mutans streptococci in 6-year-old children from a multicultural suburban area after attending an oral health program. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2008;9:94-7.

- ²² Botelho MP, Maciel SM, Cerci Neto A, Dezan CC, Fernandes KB, de Andrade FB. Cariogenic microorganisms and oral conditions in asthmatic children. *Caries Res.* 2011;45:386-92.
- ²³ Hong X, Hu DY. Salivary *Streptococcus mutans* level: value in caries prediction for 11-12-year-old children. *Community Dent Health.* 2010;27:248-52.
- ²⁴ Estrela CR, Pimenta FC, Alencar AH, Ruiz LF, Estrela C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18:426-31.
- ²⁵ Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Holzhausen M, Franco GC, Costa Fde O, Fine D. Clinical status and detection of periodontopathogens and *Streptococcus mutans* in children with high levels of supragingival biofilm. *Braz Oral Res.* 2009;23:313-8.
- ²⁶ Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:736-41.
- ²⁷ André RF, Andrade IM, Silva-Lovato CH, Paranhos Hde F, Pimenta FC, Ito IY. Prevalence of mutans streptococci isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. *Braz Dent J.* 2011;22:62-7.
- ²⁸ Pramod S, Kailasam V, Padmanabhan S, Chitharanjan AB. Presence of cariogenic streptococci on various bracket materials detected by polymerase chain reaction. *Aust Orthod J.* 2011;27:46-51.
- ²⁹ Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8:59-70.
- ³⁰ Hong X, Hu DY. Salivary *Streptococcus mutans* level: value in caries prediction for 11-12-year-old children. *Community Dent Health.* 2010; 27: 248-52.
- ³¹ Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Flores-Ferreira BI, Patiño-Marin N, Alpuche-Solis AG, Reyes-Macias JF. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *J Clin Pediatr Dent.* 2008;32:121-6.
- ³² Franco e Franco TC, Amoroso P, Marin JM, de Avila FA. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Braz Dent J.* 2007;18:329-33.
- ³³ Wu H, Fan M, Zhou X, Mo A, Bian Z, Zhang Q, Chen Z. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China. *Caries Res.* 2003;37:374-80.
- ³⁴ Seki M, Karakama F, Terajima T, Ichikawa Y, Ozaki T, Yoshida S, Yamashita Y. Evaluation of mutans streptococci in plaque and saliva: correlation with caries development in preschool children. *J Dent.* 2003;31:283-90.
- ³⁵ Irigoyen Camacho ME, Sánchez Pérez L, García Pérez A, Zepeda Zepeda MA. Relationship between severe early childhood caries, mother's oral health and mutans streptococci in a low-income group: changes from 1996 to 2007. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;33:241-6.
- ³⁶ Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Aust Dent J.* 2007;52:93-100.
- ³⁷ Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009;37:241-9.
- ³⁸ Warren JJ, Weber-Gasparoni K, Marshall TA, Drake DR, Dehkordi-Vakil F, Kolker JL, Dawson DV. Factors associated with dental caries experience in 1-year-old children. *J Public Health Dent.* 2008;68:70-5.
- ³⁹ Filoche SK, Anderson SA, Sissons CH. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:322-6.
- ⁴⁰ Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmentree A, Dahlén G. *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25:157-64.
- ⁴¹ Caufield PW, Li Y, Dasanayake A, Saxena D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res.* 2007;41:2-8.
- ⁴² Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Kjaeldgaard M. High levels of salivary lactobacilli in Estonian schoolchildren. *Eur J Paediatr Dent.* 2004;5:107-9.
- ⁴³ Klink T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009;43:83-91.

- ⁴⁴ Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Res.* 2008;42:449-53.
- ⁴⁵ Tenuta LM, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res.* 2006;40:546-9.
- ⁴⁶ Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompejus M, Tanzer JM. Specific Lactobacillus/Mutans Streptococcus co-aggregation. *J Dent Res.* 2010;89:175-9.
- ⁴⁷ Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2011;69:263-8.
- ⁴⁸ Tanzer JM, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A, Reindl A, Pompejus M. Caries inhibition by and safety of Lactobacillus paracasei DSMZ16671. *J Dent Res.* 2010;89:921-6.
- ⁴⁹ Simark-Mattsson C, Emilson CG, Håkansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:308-14.
- ⁵⁰ Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscü OO, Sandalli N, Holgersson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig.* 2007;11:425-9.
- ⁵¹ Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus reuteri ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand.* 2006;64:314-8.
- ⁵² Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2010;10:18.
- ⁵³ Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, Korpela R. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002;47:799-804.
- ⁵⁴ Sinkiewicz G, Cronholm S, Ljunggren L, Dahlén G, Bratthall G. Influence of dietary supplementation with Lactobacillus reuteri on the oral flora of healthy subjects. *Swed Dent J.* 2010;34:197-206.
- ⁵⁵ Köll P, Mändar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarström L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:139-47.
- ⁵⁶ Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:354-61.
- ⁵⁷ Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, Hirata H. Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35:897-905.
- ⁵⁸ Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic Lactobacillus reuteri. *Swed Dent J.* 2006;30:55-60.
- ⁵⁹ Iwamoto T, Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Hirofujii T. Effects of probiotic Lactobacillus salivarius WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:201-8.
- ⁶⁰ Lexner MO, Blomqvist S, Dahlén G, Twetman S. Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria - a pilot study. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8:383-8.
- ⁶¹ Kneist S, Schmidt F, Callaway A, Willershausen B, Rupp S, Wicht M, Thiede B. Diversity of Lactobacillus species in deep carious lesions of primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010;11:181-6.
- ⁶² Avlami A, Kordosis T, Vrizidis N, Sipsas NV. Lactobacillus rhamnosus endocarditis complicating colonoscopy. *J Infect.* 2001;42:283-5.
- ⁶³ Chuang LC, Huang CS, Ou-Yang LW, Lin SY. Probiotic Lactobacillus paracasei effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Investig.* 2011;15:471-6.
- ⁶⁴ Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, Shintani S, Ooshima T. Cariogenicity of the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius in rats. *Caries Res.* 2005;39:479-83.
- ⁶⁵ Negroni M. Familia *Actinomycetaceae* y actinomicosis. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.329-36.
- ⁶⁶ Liébana J, Pontón J, Benito L. Bacilos grampositivos anaerobios facultativos de interés oral. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.345-54.

- ⁶⁷ Ryan KJ. *Actinomyces y Nocardia*. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. 4 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 507-14.
- ⁶⁸ Tang G, Samaranayake LP, Yip HK, Chu FC, Tsang PC, Cheung BP. Direct detection of *Actinomyces* spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. *J Dent*. 2003;31:559-68.
- ⁶⁹ Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod*. 2002;28:168-72.
- ⁷⁰ Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2003;29:549-52.
- ⁷¹ Yip HK, Guo JH, Wong WH. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. *J Dent*. 2007;35:377-82.
- ⁷² de Oliveira Cordeiro JG. Experimental root surface caries in hamsters the development of the disease after inoculations of two types of cariogenic bacteria. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1995;42:83-103.
- ⁷³ Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in caries-active preschool children. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19:371-8.
- ⁷⁴ Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*. 2008;35:106-13.
- ⁷⁵ Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*. 2004;31:996-1002.
- ⁷⁶ López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75:717-25.
- ⁷⁷ Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27:722-32.
- ⁷⁸ Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J*. 1998;31:39-47.
- ⁷⁹ Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol*. 2006;77:460-71.
- ⁸⁰ Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol*. 2005;76:778-84.
- ⁸¹ Watkins KV, Richmond AS, Langstein IM. Nonhealing extraction site due to *Actinomyces naeslundii* in patient with AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;71:675-7.
- ⁸² Negroni M. Enfermedades bacterianas 2ª parte: Estafilococos. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.353-8.
- ⁸³ Prats G, Mirelis B. Diversidad bacteriana. Principales bacterias en patología humana. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.303-16.
- ⁸⁴ Gutiérrez J, Gamboa FO, Zaragoza MT. Género *Staphylococcus* y bacterias relacionadas. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.317-24.
- ⁸⁵ Ryan KJ. Estafilococos. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. 4 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 285-96.
- ⁸⁶ Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastro ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam*. 2010;23:20-6.
- ⁸⁷ Rams TE, Feik D, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5:29-32.
- ⁸⁸ Fritschi BZ, Albert-Kiszely A, Persson GR. *Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis. *J Dent Res*. 2008;87:589-93.
- ⁸⁹ Zuanazzi D, Souto R, Mattos MB, Zuanazzi MR, Tura BR, Sansone C, Colombo AP. Prevalence of potential bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalised individuals. *Arch Oral Biol*. 2010;55:21-8.
- ⁹⁰ Matsuura T, Kohada A, Yamamoto T, Miyake Y, Akagawa Y, Suganaka H, Tsuru H. High incidence of *Staphylococcus aureus* from dentures and tongues of maxillary resection patients. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12:354-7.

- ⁹¹ Scannapieco FA, Mylotte JM. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. J Periodontol. 1996;67:1114-22.
- ⁹² Al Maghlouth A, Al Yousef Y, Al Bagieh N. Qualitative and quantitative analysis of bacterial aerosols. J Contemp Dent Pract. 2004;5:91-100.
- ⁹³ Motta RH, Ramacciato JC, Groppo FC, Pacheco Ade B, de Mattos-Filho TR. Environmental contamination before, during, and after dental treatment. Am J Dent. 2005;18:340-4.
- ⁹⁴ Hedge PP, Andrade AT, Bhat K. Microbial contamination of "in use" bar soap in dental clinics. Indian J Dent Res. 2006; 17:70-3.
- ⁹⁵ Ryan KJ. *Candida*, *Aspergillus* y otros hongos oportunistas. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. 4 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 725-35.
- ⁹⁶ Quindós G, Escobar T, Pontón J. Hongos de interés oral. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.487-96.
- ⁹⁷ Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. Arch Oral Biol. 1997; 42: 513-20
- ⁹⁸ Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 201-6.
- ⁹⁹ Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 106: 457-62.
- ¹⁰⁰ Negroni M. Enfermedades bacterianas. 8 parte: Enterobacterias y otras bacterias Gramnegativas. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.389-98.
- ¹⁰¹ Ryan KJ. Enterobacteriaceae. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. 4 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 373- 404.
- ¹⁰² Radice M, Martino PA, Reiter AM. Evaluation of subgingival bacteria in the dog and susceptibility to commonly used antibiotics. J Vet Dent. 2006;23:219-24.
- ¹⁰³ Scolozzi P, Lombardi T, Edney T, Jaques B. Enteric bacteria mandibular osteomyelitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:42-6.
- ¹⁰⁴ Chate RA. An audit improves the quality of water within the dental unit water lines of general dental practices across the East of England. Br Dent J. 2010;209: E11.
- ¹⁰⁵ Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Sys Bacteriol. 1984; 34:31-4.
- ¹⁰⁶ Ryan KJ. *Streptococcus* y *enterococcus*. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. 4 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 297-322.
- ¹⁰⁷ Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:95-101.
- ¹⁰⁸ Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. J Endod. 2006;32:104-9.
- ¹⁰⁹ Reynaud af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Røslie E, Peciuliene V, Haapasalo M, Shah HN. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:87-94.
- ¹¹⁰ da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol. 2011; 56:899-906.
- ¹¹¹ Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashov R, Agazadeh M, Faramarzie M. Detection of *enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15:667-70.
- ¹¹² Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. J Clin Periodontol. 1998;25:169-80.
- ¹¹³ Gonçalves LS, Soares Ferreira SM, Souza CO, Souto R, Colombo AP. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active

antiretroviral therapy and HIV-seronegative Brazilians with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:87-96.

¹¹⁴ Gonçalves LS, Ferreira SM, Silva A Jr, Villoria GE, Costinha LH, Souto R, Uzeda MD, Colombo AP. Association of T CD4 lymphocyte levels and subgingival microbiota of chronic periodontitis in HIV-infected Brazilians under HAART. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97:196-203.

¹¹⁵ Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol*. 2008;53:155-60.

¹¹⁶ Barben J, Kuehni CE, Schmid J. Water quality in dental chair units. A random sample in the canton of St. Gallen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2009;119:976-85.

¹¹⁷ Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5:149-54.

¹¹⁸ Noguero B, Liébana J, Sanz M, Herrera D, Mesa F. Microbiología periodontal y periimplantaria. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.571-96.

¹¹⁹ Ardila CM, Fernández N, Guzmán IC. Antimicrobial susceptibility of moxifloxacin against gram-negative enteric rods from colombian patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81:292-9.

¹²⁰ Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16:306-10.

¹²¹ Van de Velde T, Thevissen E, Persson GR, Johansson C, De Bruyn H. Two-year outcome with Nobel Direct implants: a retrospective radiographic and microbiologic study in 10 patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009; 11:183-93.

¹²² Brown KL. Control of bacterial spores. *Br Med Bull*. 2000;56:158-71.

¹²³ Liébana J, Pontón J, Benito L. Bacilos grampositivos anaerobios facultativos de interés oral. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.345-54.

¹²⁴ Smith KJ, Neafie R, Yeager J, Skelton HG. Micrococcus folliculitis in HIV-1 disease. *Br J Dermatol*. 1999; 141:558-61.

¹²⁵ O'Donnell MJ, Shore AC, Coleman DC. A novel automated waterline cleaning system that facilitates effective and consistent control of microbial biofilm contamination of dental chair unit waterlines: a one-year study. *J Dent*. 2006;34:648-61.

¹²⁶ Buck R, Eleazer PD, Staat RH. In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontics irrigants. *J Endod*. 1999;25:786-8.

¹²⁷ Paredes Gallardo V, Paredes Cencillo C, Mir Plana B. Prevalencia de la caries dental en el niño inmigrante: estudio comparativo con el niño autóctono. *An Pediatr*. 2006;65:337-41.

¹²⁸ Eustaquio MV, Montiel JM, Almerich JM. Oral health survey of the adult population of the Valencia region (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15: 538-44.

¹²⁹ Iglesias Corchero AM, García Cepeda JR. Oral health in people over 64 years of age, institutionalized in Centres for the Aged in the Vigo Health District Spain, 2005. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:523-8.

¹³⁰ Marcantoni M. Caries dental. Antimicrobianos y vacunas para su control. 1ª parte. Caries dental. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.247-62.

¹³¹ Baca P, Baca A, Maestre JR. Microbiología de la caries. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.561-70.

¹³² Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc*. 1960;61:9-19.

¹³³ Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25:5-12.

¹³⁴ Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004;38:182-91.

¹³⁵ Toi CS, Bönecker M, Cleaton-Jones PE. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:160-4.

¹³⁶ Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int*. 2002;33:151-9.

¹³⁷ Neelakantan P, Rao CV, Indramohan J. Bacteriology of deep carious lesions underneath amalgam restorations with different pulp-capping materials--an in vivo analysis. *J Appl Oral Sci*. 2012;20:139-45.

- ¹³⁸ Krishnakumar R, Singh S, Subba Reddy VV. Comparison of levels of mutans streptococci and lactobacilli in children with nursing bottle caries, rampant caries, healthy children with 3-5 dmft/DMFT and healthy caries free children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2002;20:1-5.
- ¹³⁹ González-Cabezas C, Li Y, Gregory RL, Stookey GK. Distribution of cariogenic bacteria in carious lesions around tooth-colored restorations. *Am J Dent*. 2002;15:248-51.
- ¹⁴⁰ Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IV, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res*. 2011;45:21-30.
- ¹⁴¹ Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. *Oral Dis*. 2002;8:207-17.
- ¹⁴² Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res*. 2001;35:397-406.
- ¹⁴³ Miller WD. An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos*. 1894; 36:505.
- ¹⁴⁴ Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ- free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340-9.
- ¹⁴⁵ Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89:321-8.
- ¹⁴⁶ Piovan S. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales, de la periimplantitis, de los conductos radiculares y de los procesos perirradiculares. 4 parte. Microbiología pulpar y perirradicular. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.319-28.
- ¹⁴⁷ Baumgartner JC, Bakland LK, Sugita EI. Microbiología de la endodoncia y asepsia en la práctica endodóntica. En: Ingle JI, Bakland LK. Endodoncia. 5 ed. México: McGraw- Hill Interamericana; 2005. p. 63-93.
- ¹⁴⁸ Gier RE, Mitchell DF. Anachoretic effect of pulpitis. *J Dent Res*. 1968; 47: 564-70.
- ¹⁴⁹ Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *J Dent Res*. 1967;46:551-3
- ¹⁵⁰ Menéndez M, Tejerina JM, Villa MA. Microbiología de los procesos endodónticos. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.597-605.
- ¹⁵¹ Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios*. 1994;80:231-43.
- ¹⁵² Peciulienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34:429-34.
- ¹⁵³ Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*. 2006; 32:722-6.
- ¹⁵⁴ Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlén G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J*. 2004;37:579-87.
- ¹⁵⁵ Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003;36:500-8.
- ¹⁵⁶ Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J*. 2008;41:508-15.
- ¹⁵⁷ Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:86-93.
- ¹⁵⁸ Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004; 30:315-20.
- ¹⁵⁹ Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod*. 2006;32:173-7.
- ¹⁶⁰ Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32:93-8.
- ¹⁶¹ Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spångberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99:112-8.

- ¹⁶² Mindere A, Kundzina R, Nikolajeva V, Eze D, Petrina Z. Microflora of root filled teeth with apical periodontitis in Latvian patients. *Stomatologija*. 2010;12:116-21.
- ¹⁶³ Chugal N, Wang JK, Wang R, He X, Kang M, Li J, Zhou X, Shi W, Lux R. Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *J Endod*. 2011;37:1359-64.
- ¹⁶⁴ Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17:367-71.
- ¹⁶⁵ Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:349-53.
- ¹⁶⁶ Anusavice KJ. Estructura de la materia y principios de la adhesión. En: Anusavice KJ. Phillips. Ciencia de los materiales dentales. 11 ed. Madrid: Elsevier; 2004. p.21-40.
- ¹⁶⁷ Baier RE. Principles of adhesion. *Oper Dent Suppl* 1992;5:1-9.
- ¹⁶⁸ Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955;34:849-53.
- ¹⁶⁹ Boyde A, Switsur VR, Stewart ADG. An assessment of two new physical methods applied to the study of dental tissues. En: *Advances in fluorine research and dental caries prevention*. Oxford, Pergamon Press, 1963. p. 185-93.
- ¹⁷⁰ Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent* 1992;17: 229-42
- ¹⁷¹ Tay FR, Pashley DH. Dental adhesives of the future. *J Adhes Dent* 2002;4:91-103.
- ¹⁷² Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;16:265-73
- ¹⁷³ Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27:17-28.
- ¹⁷⁴ Perdigao J. New developments in dental adhesion. *Dent Clin N Am* 2007; 51: 333-57
- ¹⁷⁵ Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28:215-35.
- ¹⁷⁶ Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88:558-78.
- ¹⁷⁷ Shinohara MS, de Oliveira MT, Di Hipólito V, Giannini M, de Goes MF. SEM analysis of the acid-etched enamel patterns promoted by acidic monomers and phosphoric acids. *J Appl Oral Sci*. 2006;14:427-35.
- ¹⁷⁸ Grégoire G, Ahmed Y. Evaluation of the enamel etching capacity of six contemporary self-etching adhesives. *J Dent*. 2007;35:388-97.
- ¹⁷⁹ Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987;66:1375-9.
- ¹⁸⁰ González Rodríguez E, Navajas R de Mondelo JM, Ostos Garrido MJ, Baca García P. Estudio del estado bacteriológico de las cavidades terapéuticas, antes de la colocación del material restaurador. *Rev Esp Estomatol*. 1987; 5:301-9.
- ¹⁸¹ Zoellner A, Herzberg S, Gaengler P. Histobacteriology and pulp reactions to long-term dental restorations. *J Marmara Univ Dent Fac*. 1996; 2:483-90.
- ¹⁸² Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J Endod*. 1994; 20:78-82.
- ¹⁸³ Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2000; 33:28-36.
- ¹⁸⁴ Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Bacterial penetration along different root canal filling materials in the presence or absence of smear layer. *Int Endod J*. 2008; 41:32-40.
- ¹⁸⁵ Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent*. 2003; 31:275-81.
- ¹⁸⁶ Yang SE, Cha JH, Kim ES, Kum KY, Lee CY, Jung IY. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. *J Endod*. 2006; 32:663-7.
- ¹⁸⁷ Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6:142-9.
- ¹⁸⁸ Al-Helal AS, Armstrong SR, Xie XJ, Wefel JS. Effect of smear layer on root demineralization adjacent to resin-modified glass ionomer. *J Dent Res*. 2003; 82:146-50.

- ¹⁸⁹ Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater.* 2012;28:573-83.
- ¹⁹⁰ Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009; 34:18-23.
- ¹⁹¹ Weng Y, Howard L, Chong VJ, Sun J, Gregory RL, Xie D. A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement. *Acta Biomater.* 2012;8:3153-60.
- ¹⁹² Elsaka SE, Hamouda IM, Swain MV. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. *J Dent.* 2011;39:589-98.
- ¹⁹³ Xie D, Weng Y, Guo X, Zhao J, Gregory RL, Zheng C. Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. *Dent Mater.* 2011;27:487-96.
- ¹⁹⁴ Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent.* 2011;23:46-55.
- ¹⁹⁵ Lewinstein I, Zenziper E, Block J, Kfir A. Incorporation of chlorhexidine diacetate in provisional cements: antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and the effect on tensile strength in vitro. *Int Endod J.* 2012;45:1010-7.
- ¹⁹⁶ Assouline LS, Fuss Z, Mazor Y, Weiss EI. Bacterial penetration and proliferation in root canal dentinal tubules after applying dentin adhesives in vitro. *J Endod.* 2001; 27:398-400.
- ¹⁹⁷ Silva e Souza MH Jr, Carneiro KG, Lobato MF, Silva e Souza Pde A, de Góes MF. Adhesive systems: important aspects related to their composition and clinical use. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:207-14.
- ¹⁹⁸ Carville R, Quinn F. The selection of adhesive systems for resin-based luting agents. *J Ir Dent Assoc.* 2008;54:218-22.
- ¹⁹⁹ Swift EJ Jr. Dentin/enamel adhesives: review of the literature. *Pediatr Dent.* 2002;24:456-61.
- ²⁰⁰ Cehreli ZC, Stephan A, Sener B. Antimicrobial properties of self-etching primer-bonding systems. *Oper Dent.* 2003; 28:143-8.
- ²⁰¹ Başeren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangaç B. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. *Quintessence Int.* 2005; 36:339-44.
- ²⁰² Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent.* 2002;15:356-60.
- ²⁰³ Gondim JO, Duque C, Hebling J, Giro EM. Influence of human dentine on the antibacterial activity of self-etching adhesive systems against cariogenic bacteria. *J Dent.* 2008; 36:241-8.
- ²⁰⁴ Duque C, Negrini TC, Palomari DM, Hebling J. Effect of light-activation on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *Braz J Oral Sci.* 2009; 8:175-80.
- ²⁰⁵ Kazuno T, Fukushima T, Hayakawa T, Inoue Y, Ogura R, Kaminishi H, Miyazaki K. Antibacterial activities and bonding of MMSA/TBB resin containing amphiphilic lipids. *Dent Mater J.* 2005; 24:244-50.
- ²⁰⁶ Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90:813-7.
- ²⁰⁷ Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, Ma S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent.* 2009; 37:289-96.
- ²⁰⁸ Chai Z, Li F, Fang M, Wang Y, Ma S, Xiao Y, Huang L, Chen J. The bonding property and cytotoxicity of a dental adhesive incorporating a new antibacterial monomer. *J Oral Rehabil.* 2011;38:849-56.
- ²⁰⁹ Henn S, Nedel F, de Carvalho RV, Lund RG, Cenci MS, Pereira-Cenci T, Demarco FF, Piva E. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:1797-802.
- ²¹⁰ Welch K, Cai Y, Engqvist H, Strømme M. Dental adhesives with bioactive and on-demand bactericidal properties. *Dent Mater.* 2010;26:491-9.
- ²¹¹ Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dent Mater.* 2012;28:842-52.
- ²¹² Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent.* 2012;40:485-92.

- ²¹³ Elsaka SE. Antibacterial activity and adhesive properties of a chitosan-containing dental adhesive. *Quintessence Int.* 2012;43:603-13.
- ²¹⁴ Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994;73:1437-43.
- ²¹⁵ Thomé T, Mayer MP, Imazato S, Geraldo-Martins VR, Marques MM. In vitro analysis of inhibitory effects of the antibacterial monomer MDPB-containing restorations on the progression of secondary root caries. *J Dent.* 2009;37:705-11.
- ²¹⁶ Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater.* 2003; 19(4):313-9.
- ²¹⁷ Sattabanasuk V, Burrow MF, Shimada Y, Tagami J. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. *Aust Dent J.* 2006;51:162-9.
- ²¹⁸ Doi J, Itota T, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Bonding to root caries by a self-etching adhesive system containing MDPB. *Am J Dent.* 2004; 17:89-93
- ²¹⁹ Bortolotto T, Doudou W, Stavridakis M, Ferrari M, Krejci I. Marginal adaptation after aging of a self-etching adhesive containing an antibacterial monomer. *J Adhes Dent.* 2007;9:311-7.
- ²²⁰ Khoroushi M, Mansoori M. Marginal sealing durability of two contemporary self-etch adhesives. *ISRN Dent.* 2012;2012:204813.
- ²²¹ Alptekin T, Ozer F, Unlu N, Cobanoglu N, Blatz MB. In vivo and in vitro evaluations of microleakage around Class I amalgam and composite restorations. *Oper Dent.* 2010;35:641-8.
- ²²² Er K, Taşdemir T, Bayramoğlu G, Siso SH. Comparison of the sealing of different dentin bonding adhesives in root-end cavities: a bacterial leakage study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:152-8.
- ²²³ Uysal T, Ulker M, Baysal A, Usumez S. Microleakage under lingual retainer composite bonded with an antibacterial monomer-containing adhesive system. *World J Orthod.* 2009;10:196-201.
- ²²⁴ Fathi B, Bahcall J, Maki JS. An in vitro comparison of bacterial leakage of three common restorative materials used as an intracoronal barrier. *J Endod.* 2007;33:872-4.
- ²²⁵ Türkün LS, Ateş M, Türkün M, Uzer E. Antibacterial activity of two adhesive systems using various microbiological methods. *J Adhes Dent.* 2005; 7:315-20.
- ²²⁶ Hegde MN, Hegde P, Shetty V, Sampath PB. Assessment of antibacterial activity of self-etching dental adhesive systems: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2008;11:150-3.
- ²²⁷ Vaidyanathan M, Sheehy EC, Gilbert SC, Beighton D. Antimicrobial properties of dentine bonding agents determined using in vitro and ex vivo methods. *J Dent.* 2009;37:514-21.
- ²²⁸ Brandt PD, Botha FS, de Wet FA. Antibacterial properties of five bonding agents. *SADJ.* 2008;63:448-51.
- ²²⁹ Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc.* 2007;138:349-54.
- ²³⁰ Kuramoto A, Imazato S, Walls AW, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *J Dent Res.* 2005; 84:89-93
- ²³¹ Imazato S, Imai T, Russell RR, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39:511-5
- ²³² Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater.* 2006; 22:527-32
- ²³³ Korkmaz Y, Ozalp M, Attar N. Comparison of the antibacterial activity of different self-etching primers and adhesives. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9:57-64
- ²³⁴ Türkün M, Türkün LS, Ergücü Z, Ateş M. Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants? *Am J Dent.* 2006; 19:166-70
- ²³⁵ Brandt PD, de Wet FA, Botha SJ, de Wet BJ. Anti-bacterial efficacy of new self-etching dentine bonding agent. *SADJ.* 2004; 59:280-2.
- ²³⁶ Ozer F, Unlü N, Karakaya S, Ergani O, Hadimli HH. Antibacterial activities of MDPB and fluoride in dentin bonding agents. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2005; 13:139-42
- ²³⁷ Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater.* 2007;23:170-6.
- ²³⁸ Shinohara MS, De Goes MF, Schneider LF, Ferracane JL, Pereira PN, Di Hipólito V, Nikaido T. Fluoride-containing adhesive: durability on dentin bonding. *Dent Mater.* 2009;25:1383-91.

-
- ²³⁹ Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Oper Dent*. 2010;35:448-53.
- ²⁴⁰ Pinto CF, Paes-Leme AF, Ambrosano GM, Giannini M. In vitro secondary caries inhibition by adhesive systems in enamel around composite restorations. *Oper Dent*. 2010;35:345-52.
- ²⁴¹ Pinto CF, Leme AF, Ambrosano GM, Giannini M. Effect of a fluoride- and bromide-containing adhesive system on enamel around composite restorations under high cariogenic challenge in situ. *J Adhes Dent*. 2009;11:293-7.
- ²⁴² da Silva BM, França FM, Flório FM, Basting RT. In situ anticariogenic effect of adhesive systems containing fluoride and MDPB. *Am J Dent*. 2010;23:75-80.
- ²⁴³ Giammanco GM, Cumbo EM, Luciani A, Gallina G, Mammina C, Pizzo G. In vitro evaluation of the antibacterial activity of cured dentin/enamel adhesive incorporating the antimicrobial agent MDPB. *New Microbiol*. 2009;32:385-90.
- ²⁴⁴ Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 1. Current status and projected future developments in bonding and adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;130:445-51.
- ²⁴⁵ Al-Musallam TA, Evans CA, Drummond JL, Matasa C, Wu CD. Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;129:245-51.
- ²⁴⁶ Arhun N, Arman A, Cehreli SB, Arikan S, Karabulut E, Gülşahi K. Microleakage beneath ceramic and metal brackets bonded with a conventional and an antibacterial adhesive system. *Angle Orthod*. 2006;76:1028-34.
- ²⁴⁷ Saito K, Hayakawa T, Kawabata R, Meguro D, Kasai K. In vitro antibacterial and cytotoxicity assessments of an orthodontic bonding agent containing benzalkonium chloride. *Angle Orthod*. 2009;79:331-7.
- ²⁴⁸ Spencer CG, Campbell PM, Buschang PH, Cai J, Honeyman AL. Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent. *Angle Orthod*. 2009;79:317-22.
- ²⁴⁹ Uysal T, Amasyali M, Ozcan S, Koyuturk AE, Sagdic D. Effect of antibacterial monomer-containing adhesive on enamel demineralization around orthodontic brackets: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139:650-6.
- ²⁵⁰ Paschos E, Kleinschrodt T, Clementino-Luedemann T, Huth KC, Hickel R, Kunzelmann KH, Rudzki-Janson I. Effect of different bonding agents on prevention of enamel demineralization around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135:603-12.
- ²⁵¹ Holzmeier M, Schaubmayr M, Dasch W, Hirschfelder U. A new generation of self-etching adhesives: comparison with traditional acid etch technique. *J Orofac Orthop*. 2008;69:78-93.
- ²⁵² Siso HS, Kustarci A, Göktolga EG. Microleakage in resin composite restorations after antimicrobial pre-treatments: effect of KTP laser, chlorhexidine gluconate and Clearfil Protect Bond. *Oper Dent*. 2009;34:321-7.
- ²⁵³ Hosoya Y, Ando S, Yamaguchi K, Oooka S, Miyazaki M, Tay FR. Quality of the interface of primary tooth dentin bonded with antibacterial fluoride-releasing adhesive. *J Dent*. 2010;38:423-30.
- ²⁵⁴ Kustarci A, Sokucu O. Effect of chlorhexidine gluconate, Clearfil Protect Bond, and KTP laser on microleakage under metal orthodontic brackets with thermocycling. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:S57-62.
- ²⁵⁵ Filho MV, Martins SH, Valdrighi HC, Vedovello SA, Kuramae M, Lucato AS, Boeck EM, Martins LR. Evaluation of bonded orthodontics brackets using different adhesive systems after a cariogenic challenge. *J Contemp Dent Pract*. 2010;11:41-8.
- ²⁵⁶ Paschos E, Kurochkina N, Huth KC, Hansson CS, Rudzki-Janson I. Failure rate of brackets bonded with antimicrobial and fluoride-releasing, self-etching primer and the effect on prevention of enamel demineralization. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135:613-20.
- ²⁵⁷ Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 27-31.
- ²⁵⁸ Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005; 31:53-6.
- ²⁵⁹ Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod*. 2001; 27:717-9.

-
- ²⁶⁰ Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. 1999; 25:167-71.
- ²⁶¹ Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99:768-72.
- ²⁶² Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod. 2003; 29:562-4.
- ²⁶³ Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 107:295-8.
- ²⁶⁴ Mc Hugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004;30:218-9.
- ²⁶⁵ Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. Aust Endod J. 2008;34:19-24
- ²⁶⁶ Molgantini M, Manto MC. Guía práctica. 4ª parte. Medios de cultivo y siembra. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.551-60.
- ²⁶⁷ Rosenow, EC. Studies on elective localization. J.Dent. Research, 1919; 1:205-49
- ²⁶⁸ Hayden, RL. Elective localization in the eye of bacteria from infected teeth. Arch Int Med. 1923;32:828-49
- ²⁶⁹ National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. M11-A43, Vol.13 No. 26. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, PA.
- ²⁷⁰ McLaughlin CB. A readily prepared medium for the cultivation of the lactobacilli. J Bacteriol. 1946;51:560.
- ²⁷¹ De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Microbiol, 1960; 23: 130-5.
- ²⁷² Roy D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. Int J Food Microbiol. 2001; 69: 167-82.
- ²⁷³ Molgantini S, Manto MC. Guía práctica. 5ª parte. Pruebas de sensibilidad *in vitro* a los agentes antimicrobianos. En: Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p.561-72.
- ²⁷⁴ Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45:493-6.
- ²⁷⁵ Castillo AM, Liébana J, Liñares J. Antibióticos (I). Concepto y clasificación. Estudio de la sensibilidad *in vitro*. En: Liébana J. Microbiología oral. 2 ed. España: McGraw- Hill Interamericana; 2002. p.115-25.
- ²⁷⁶ McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA. 1907; 49: 1176-8.
- ²⁷⁷ Salz U, Bock T. Adhesion performance of new hydrolytically stable one-component self-etching enamel/dentin adhesives. J Adhes Dent. 2010;12:7-10.
- ²⁷⁸ Salz U, Zimmermann J, Zeuner F, Moszner N. Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. J Adhes Dent. 2005;7:107-16.
- ²⁷⁹ El-Deeb HA, Al Sherbiney HH, Mobarak EH. Bond durability of adhesives containing modified-monomer with/without-fluoride after aging in artificial saliva and under intrapulpal pressure simulation. Oper Dent. 2013;38:48-56.
- ²⁸⁰ Ma S, Izutani N, Imazato S, Chen JH, Kiba W, Yoshikawa R, Takeda K, Kitagawa H, Ebisu S. Assessment of bactericidal effects of quaternary ammonium-based antibacterial monomers in combination with colloidal platinum nanoparticles. Dent Mater J. 2012;31:150-6.
- ²⁸¹ Baca P, Furtado-Antunes de Freitas M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Arias-Moliz MT. In vitro *Enterococcus faecalis* biofilm formation on five adhesive systems. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17:501-5.
- ²⁸² Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. Dent Mater. 2003;19:449-57.